

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**  
**Departamento de Producción Animal**



**EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL EN EL  
CARCINOMA INFLAMATORIO MAMARIO  
CANINO.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**  
**PRESENTADA POR**

**Ana Rodríguez Sánchez-Archidona**

Bajo la dirección de la doctora

Susana Dunner Boxberger

**Madrid, 2010**

- ISBN: 978-84-693-3364-8

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

Departamento de Producción Animal



**EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL EN EL  
CARCINOMA INFLAMATORIO MAMARIO CANINO**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE  
DOCTOR POR**

Ana Rodríguez Sánchez-Archidona

Bajo la dirección de la Doctora:  
Susana Dunner Boxberger

**Madrid, 2008**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**



**EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL  
EN EL CARCINOMA INFLAMATORIO  
MAMARIO CANINO**

Tesis Doctoral

Ana Rodríguez Sánchez-Archidona

Madrid 2008

***UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID***

***Facultad de Veterinaria***

**Expresión Génica Diferencial en el  
Carcinoma Inflamatorio Mamario  
Canino**

***Memoria presentada por Ana Rodríguez Sánchez-Archidona para optar al grado de  
Doctor, realizada en el Departamento de Producción Animal de la Facultad  
de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid y dirigida por  
la Dra. Susana Dunner Boxberger***

## ***AGRADECIMIENTOS***

Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que de una forma u otra han hecho posible la realización de esta tesis doctoral, especialmente a :

La Dra. Susana Dunner, mi directora de tesis, por sus conocimientos y experiencia aportados, y que junto con el Dr. Javier Cañón me aceptaron en su grupo de trabajo.

Las instituciones que me han permitido la realización del estudio, como el Ministerio de Educación y Ciencia que me concedió la beca FPU y la Universidad Complutense de Madrid.

También quiero agradecer a Laura Peña, Juan Carlos Illera, Lola Pérez-Alenza y Gema Silván su colaboración dentro del proyecto.

A los compañeros del laboratorio, becarios de anatomía patológica y fisiología, y técnicos, tanto los que están ahora como los que ya no trabajan en la Universidad, gracias por su ayuda y tiempo.

Sobre todo me gustaría dar las gracias a las personas que fuera de la facultad me han apoyado y animado día a día, como mi familia y amigos, sin ellos no hubiese podido llevar a cabo este proyecto profesional y personal.

## ***I. ÍNDICE DE CONTENIDOS***



<b>I. ÍNDICE DE CONTENIDOS.....</b>	<b>1</b>
<b>II. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....</b>	<b>9</b>
<b>III. ABREVIATURAS .....</b>	<b>15</b>
<b>IV. RESUMEN-ABSTRACT.....</b>	<b>19</b>
<b>V. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>23</b>
<b>1 CÁNCER DE MAMA .....</b>	<b>23</b>
<b>1.1 GLÁNDULA MAMARIA .....</b>	<b>23</b>
<b>1.2 EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER MAMARIO CANINO .....</b>	<b>23</b>
<b>1.3 ETIOPATOGENIA .....</b>	<b>24</b>
1.3.1 Factor hormonal.....	25
1.3.2 Factor de Crecimiento Insulínico tipo I.....	26
1.3.3 Prolactina y Hormona del crecimiento .....	27
1.3.4 Metaloproteinasas .....	27
1.3.5 Ciclooxygenasa 2 (COX-2) .....	27
1.3.6 Moléculas de adhesión .....	28
1.3.7 Colesterol .....	28
1.3.8 Sistema inmune .....	29
1.3.9 Oncogenes .....	29
1.3.10 Genes supresores de tumores .....	30
1.3.11 Ciclo celular .....	31
1.3.12 Angiogénesis tumoral .....	32
1.3.13 Telomerasa .....	32
1.3.14 Metástasis .....	33
1.3.15 Factores epigenéticos.....	33
<b>1.4 SÍNTOMAS CLÍNICOS .....</b>	<b>34</b>
<b>1.5 PATOLOGÍA .....</b>	<b>34</b>
<b>1.6 DIAGNÓSTICO.....</b>	<b>35</b>
<b>1.7 TRATAMIENTO .....</b>	<b>35</b>
1.7.1 Manejo Clínico .....	35
1.7.2 Cirugía.....	36
1.7.3 Quimioterapia.....	36
1.7.4 Radioterapia .....	36
1.7.5 Tratamientos Hormonales .....	37
1.7.6 Inmunoterapia .....	38
1.7.7 Otros .....	38
<b>1.8 PRONÓSTICO .....</b>	<b>39</b>
<b>2 CARCINOMA INFLAMATORIO MAMARIO .....</b>	<b>41</b>
<b>2.1 HISTORIA.....</b>	<b>41</b>
<b>2.2 EPIDEMIOLOGÍA.....</b>	<b>41</b>
<b>2.3 CLASIFICACIÓN.....</b>	<b>42</b>
<b>2.4 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.....</b>	<b>43</b>
2.4.1 Carcinoma inflamatorio mamario en la mujer .....	43
2.4.2 Carcinoma inflamatorio mamario en la perra.....	44
<b>2.5 FORMAS CLÍNICAS DE PRESENTACIÓN DEL CARCINOMA INFLAMATORIO.....</b>	<b>45</b>
<b>2.6 ETIOPATOGENIA .....</b>	<b>46</b>
<b>2.7 PATOLOGÍA .....</b>	<b>46</b>



<b>2.8</b>	<b>DIAGNÓSTICO</b>	<b>49</b>
<b>2.9</b>	<b>FACTORES PRONÓSTICOS</b>	<b>50</b>
<b>2.10</b>	<b>CARCINOMA INFLAMATORIO MAMARIO OCULTO</b>	<b>53</b>
<b>2.11</b>	<b>TRATAMIENTO</b>	<b>54</b>
2.11.2	<i>Futuros tratamientos</i>	56
<b>2.12</b>	<b>MODELOS <i>IN VIVO</i> E <i>IN VITRO</i></b>	<b>57</b>
2.12.1	<i>Líneas celulares</i>	57
2.12.2	<i>Modelos in vivo</i>	57
<b>2.13</b>	<b>CARACTERÍSTICAS MOLECULARES: GENES IMPLICADOS</b>	<b>58</b>
2.13.1	<i>Genes asociados a tumores mamarios</i>	58
2.13.2	<i>Genes inflamatorios</i>	59
2.13.3	<i>Genes relacionados con angiogénesis</i>	60
2.13.4	<i>Genes implicados en el carcinoma inflamatorio mamario</i>	60
2.13.5	<i>Subtipos moleculares</i>	61
<b>3</b>	<b>METODOLOGÍA TÉCNICA</b>	<b>63</b>
<b>3.1</b>	<b>BIOLOGÍA MOLECULAR Y CÁNCER</b>	<b>63</b>
<b>3.2</b>	<b>TÉCNICAS PARA EL ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA</b>	<b>64</b>
3.2.1	<i>Differential Display</i>	65
3.2.2	<i>PCR a tiempo real</i>	67
3.2.3	<i>Elección de las técnicas</i>	71
<b>3.4</b>	<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	<b>72</b>
<b>VI.</b>	<b>OBJETIVO</b>	<b>75</b>
<b>VII.</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>79</b>
<b>1</b>	<b>MATERIAL BIOLÓGICO</b>	<b>79</b>
<b>1.1</b>	<b>CRITERIOS DE SELECCIÓN DE CASOS</b>	<b>79</b>
<b>1.2</b>	<b>RECOGIDA DE MUESTRAS</b>	<b>79</b>
<b>1.3</b>	<b>CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA</b>	<b>80</b>
<b>1.4</b>	<b>CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS</b>	<b>80</b>
<b>2.1</b>	<b>EXTRACCIÓN DE ARN</b>	<b>81</b>
<b>2.2</b>	<b>CALIDAD, CANTIDAD Y PUREZA DE ARN</b>	<b>81</b>
<b>2.3</b>	<b>REACCIÓN DE RETROTRANSCRIPCIÓN</b>	<b>81</b>
<b>2.4</b>	<b>DIFFERENTIAL DISPLAY</b>	<b>82</b>
2.4.1	<i>Amplificación de ADNc</i>	82
2.4.2	<i>Electroforesis</i>	84
2.4.3	<i>Tinción</i>	85
2.4.4	<i>Selección de la bandas diferenciales</i>	86
2.4.5	<i>Recuperación de bandas</i>	86
2.4.6	<i>Reamplificación de la bandas</i>	86
2.4.7	<i>Aislamiento de las bandas</i>	87
2.4.8	<i>Purificación del producto de PCR</i>	87
2.4.9	<i>Secuenciación</i>	87
2.4.10	<i>Purificación de la reacción de secuenciación</i>	88
2.4.11	<i>Análisis de la secuencias</i>	89
<b>2.5</b>	<b>REAL TIME PCR O PCR CUANTITATIVA</b>	<b>89</b>
2.5.2	<i>Diseño de cebadores</i>	90
2.5.3	<i>Construcción de la recta patrón del gen a cuantificar</i>	92
2.5.4	<i>Genes de referencia</i>	93
2.5.6	<i>Normalización de la medida de expresión</i>	93

<b>3</b>	<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>95</b>
<b>VIII.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>99</b>
<b>1</b>	<b>DIFFERENTIAL DISPLAY .....</b>	<b>99</b>
<b>1.1</b>	<b>RESULTADOS OBTENIDOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE DIFFERENTIAL DISPLAY....</b>	<b>99</b>
<b>1.2</b>	<b>VALIDACIÓN DE RESULTADOS MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL.....</b>	<b>102</b>
1.2.1	Banda 1.....	103
1.2.2	Banda 5-6 .....	103
1.2.3	Banda 7.....	104
1.2.4	Banda 8-14 .....	104
1.2.5	Banda 9.....	105
1.2.6	Banda 11.....	105
1.2.7	Banda 16.....	105
1.2.8	Banda 18.....	106
1.2.9	Banda 19.....	106
1.2.10	Banda 23.....	106
1.2.11	Banda 24.....	107
1.2.12	Banda 25.....	107
1.2.13	Banda 31.....	107
1.2.14	Banda 33.....	108
1.2.15	Banda 37.....	108
<b>2</b>	<b>GENES CANDIDATOS.....</b>	<b>111</b>
<b>2.1</b>	<b>GENES IMPLICADOS EN RUTAS HORMONALES.....</b>	<b>111</b>
2.1.1	Receptores de estrógenos .....	111
2.1.2	Receptor de andrógenos .....	112
2.1.3	Aromatasa.....	112
2.1.4	STS.....	113
2.1.5	EST .....	113
2.1.6	17HSD1 y 17HSD2.....	113
2.1.7	SULT1A1 .....	113
2.1.8	Receptor de progesterona.....	114
<b>2.2</b>	<b>ANGIOGÉNESIS .....</b>	<b>114</b>
2.2.1	Factor de crecimiento vascular-endotelial.....	114
2.2.2	Angiopoyetina 1 y Angiopoyetina 2.....	115
2.2.3	CD34.....	116
2.2.4	LYVE-1 .....	116
2.2.5	Factor de Von Willebrand.....	117
<b>2.3</b>	<b>ADHESIÓN CELULAR Y TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES .....</b>	<b>117</b>
2.3.1	PECAM.....	117
2.3.2	ESAM.....	118
2.3.3	THBS1.....	118
2.3.4	CD47.....	118
2.3.5	Endoglina .....	119
2.3.6	FNI .....	119
2.3.7	CDH5.....	120
<b>2.4</b>	<b>INVASIÓN Y METÁSTASIS.....</b>	<b>120</b>
2.4.1	Metaloproteinasa de matriz 2.....	120
<b>2.5</b>	<b>GENES RELACIONADOS CON LA RUTA DEL ACIDO ARAQUIDÓNICO .....</b>	<b>121</b>
2.5.1	COX-1.....	121

2.5.2	COX-2.....	121
<b>2.6</b>	<b>FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN.....</b>	<b>121</b>
2.6.1	FOS.....	121
2.6.2	JUN.....	122
2.6.3	PIK3R1 .....	122
2.6.4	MYC.....	123
<b>2.7</b>	<b>GENES ASOCIADOS CON CÁNCER DE MAMA .....</b>	<b>123</b>
2.7.1	erbB-2 .....	123
2.7.2	WISP3 .....	124
2.7.3	CDKN1A.....	124
<b>IX.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>127</b>
<b>1</b>	<b>GENES OBTENIDOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE DIFFERENTIAL DISPLAY.....</b>	<b>127</b>
<b>1.1</b>	<b>BANDAS DIFFERENTIAL DISPLAY .....</b>	<b>127</b>
1.1.1	Banda 1.....	127
1.1.2	Bandas 9 y 18 (PHF14 y Tetratricopéptido TTC3 ).....	129
1.1.3	Banda 11 (CAV1) .....	130
1.1.4	Otras bandas .....	132
<b>2</b>	<b>GENES CANDIDATOS.....</b>	<b>135</b>
<b>2.1</b>	<b>GENES IMPLICADOS EN RUTAS HORMONALES.....</b>	<b>135</b>
2.1.2	Enzima sulfotransferasa 1 A 1 (SULT1A1) .....	139
<b>2.3</b>	<b>ANGIOGÉNESIS .....</b>	<b>140</b>
<b>2.3</b>	<b>ADHESIÓN CELULAR Y TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES .....</b>	<b>149</b>
<b>2.4</b>	<b>INVASIÓN Y METÁSTASIS.....</b>	<b>154</b>
<b>2.5</b>	<b>GENES RELACIONADOS CON LA RUTA DEL ACIDO ARAQUIDÓNICO .....</b>	<b>156</b>
<b>2.6</b>	<b>FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN.....</b>	<b>159</b>
2.6.1	Genes c-FOS y c-JUN .....	159
2.6.2	PIK3R1 .....	160
2.6.3	MYC.....	160
<b>2.7</b>	<b>GENES ASOCIADOS CON CÁNCER DE MAMA .....</b>	<b>161</b>
2.7.1	erbB-2 .....	161
2.7.2	WISP3 .....	162
2.7.3	CDKN1A.....	162
<b>X.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>167</b>
<b>XI.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>171</b>
<b>XII.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>215</b>

## ***II. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS***



## II. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

### V. Introducción:

#### Capítulo 1.5 Patología del cáncer de mama.

Figura V.1.1. Glándula mamaria normal .....	35
Figura V.1.2. Adenocarcinoma sólido positivo para el Antígeno de proliferación nuclear (APN). Inmunohistoquímica para APN Bar=80µm .....	35

#### Capítulo 2.4.1 Características clínicas del carcinoma inflamatorio mamario en la mujer.

Figura V.2.1. Carcinoma inflamatorio mamario en mujer: marcado aumento del tamaño de la mama y eritema .....	44
---	----

#### Capítulo 2.4.1 Características clínicas del carcinoma inflamatorio mamario en la perra.

Figuras V.2.2 y V.2.3. Carcinoma inflamatorio mamario en la especie canina: placas edematosas y eritema .....	45
--	----

#### Capítulo 2.7 Patología del carcinoma inflamatorio mamario.

Figura V.2.4. Carcinoma inflamatorio mamario canino. Células metastásicas en un vaso linfático positivas para el receptor de estrógenos $\beta$ . Streptavidina-biotina-peroxidasa .....	48
Figura V.2.5. Carcinoma inflamatorio mamario canino. Carcinoma tubular poco reactivo para receptores de andrógenos .....	48

#### Capítulo 2.8 Diagnóstico del carcinoma inflamatorio mamario.

Figura V.2.6. Mamografía medio-lateral derecha de mujer con carcinoma inflamatorio mamario. Incremento difuso de la densidad y del dibujo trabecular cutáneo .....	49
Figura V.2.7. Resonancia Magnética de mujer de 43 años con carcinoma inflamatorio mamario. Nódulo en mama derecha. Aumento difuso de la densidad cutánea .....	49

#### Capítulo 2.11 Tratamiento del carcinoma inflamatorio mamario.

Figura V.2.8. Secuencia de tratamiento del carcinoma inflamatorio mamario .....	55
---	----

#### Capítulo 2.12.2 Modelos *in vivo*

Figura V.2.9. Modelo WIBC-9 .....	57
-----------------------------------	----

#### Capítulo 3.2.1 Differential Display

Figura V.3.1. Esquema del protocolo de Differential Display .....	66
---	----

Figura V.3.2. Gel de poliacrilamida: Differential Display .....	67
---	----

### **Capítulo 3.2.1 PCR a tiempo real**

Figura V.3.3. Gráfica que recoge la señal de amplificación en función de los ciclos de PCR. Muestra las fases de la PCR a tiempo real .....	69
--	----

## **IX. Discusión:**

### **Capítulo 1.1 Bandas Differential Display.**

Figura IX.1.1. Región cromosómica Hsa 1q23.3 que incluye a la banda 1 .....	128
---	-----

### **Capítulo 1.2 Banda 1.**

Figura IX.1.2. Dominio TPR .....	129
----------------------------------	-----

### **Capítulo 1.4 Tetratricopéptido TTC3 (banda 18).**

Figura IX.1.3. Selección celular mediante la técnica de micro-disección por captura láser .....	133
---	-----

### **Capítulo 2.1 Genes implicados en rutas hormonales.**

Figura IX.2.1. Ruta metabólica de la biosíntesis y el metabolismo de los estrógenos .....	138
---	-----

Figura IX.2.2. Carcinoma inflamatorio mamario canino. Carcinoma rico en lípidos. H-E 40x. Abundantes gotas lipídicas en las células neoplásicas .....	139
--	-----

### **Capítulo 2.3 Genes relacionados con la ruta del ácido araquidónico.**

Figura IX.2.3. Las ciclooxigenasas 1 y 2 transforman el ácido araquidónico en prostaglandina H2 (PGH2) que a su vez es convertida en tromboxano A2 (TXA2), prostaglandina I2 (PGI2), prostaglandina D2 (PGD2), prostaglandina F2 (PGF2) y prostaglandina E2 (PGE2) .....	157
--	-----

### **Capítulo 2.5.3 CDKN1A.**

Figura IX.2.4. Esquema del ciclo celular y de las distintas ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas que intervienen .....	163
--	-----

**VII. Material y Métodos:****Capítulo 2.3 Reacción de retrotranscripción.**

Tabla VII.2.1. Protocolo de la reacción de transcripción inversa .....	82
Tabla VII.2.2. Programa de amplificación de la reacción de transcripción inversa .....	82

**Capítulo 2.4.1 Amplificación de ADNc.**

Tabla VII.2.3. Secuencias de los cebadores poli-T utilizados en Differential Display .....	83
Tabla VII.2.4. Secuencias de los cebadores arbitrarios utilizados en Differential Display .....	83
Tabla VII.2.5. Concentración inicial, concentración final y volúmenes de la reacción de amplificación .....	84
Tabla VII.2.6. Protocolo de amplificación .....	84

**Capítulo 2.4.6 Reamplificación de la bandas.**

Tabla VII.2.7. Concentración inicial, concentración final y volúmenes de la reacción de reamplificación .....	86
Tabla VII.2.8. Protocolo de temperatura de la reacción de reamplificación .....	87

**Capítulo 2.4.9 Secuenciación.**

Tabla VII.2.9. Condiciones de la reacción de secuenciación .....	88
Tabla VII.2.10. Programa de la reacción de secuenciación .....	88

**Capítulo 2.5 Real Time PCR o PCR cuantitativa.**

Tabla VII.2.11. Concentración inicial, concentración final y volúmenes de la PCR .....	90
Tabla VII.2.12. Programa de amplificación de la PCR cuantitativa .....	90

**VIII. Resultados:****Capítulo 1.1 Resultados obtenidos mediante la técnica de Differential Display.**

Tabla VIII.1.1. Bandas con expresión diferencial entre los distintos grupos de animales: denominación y tamaño del fragmento, gel del cual fueron recuperadas y combinación de cebadores del cual se obtuvo el fragmento .....	100
Tabla VIII.1.2. Bandas comparadas e identificadas en bases de datos .....	102



Tabla VIII.1.3. Bandas obtenidas mediante la técnica de Differential Display: gen al que corresponden, función molecular, proceso biológico en el que participan y localización celular .....	109
---	-----



### ***III. ABREVIATURAS***



### III. ABREVIATURAS

17HSD- 17 $\beta$  hidroxiesteroide-deshidrogenasa

$\mu$ l – microlitro

ADN – ácido desoxirribonucleico

ARN – ácido ribonucleico

AJCC- American Joint Committee on Cancer

ANGPT1- angiopoyetina 1

ANGPT2- angiopoyetina 2

CAM- moléculas de adhesión celular

CDH5- cadherina 5

CDK- quinasas dependientes de ciclinas

CI- carcinoma inflamatorio

CIO- carcinoma inflamatorio oculto

COX-1- ciclooxigenasa 1

COX-2- ciclooxigenasa 2

Ct- Threshold Cycle

DD- Differential Display

EGF- factor de crecimiento epidérmico

ESAM- molécula de adhesión endotelial  
célula-selectiva

ESR1- gen que codifica para el receptor de  
estrógenos  $\alpha$

ESR2- gen que codifica para el receptor de  
estrógenos  $\beta$

EST- estrona sulfotransferasa

FN1- fibronectina 1

GAPDH- gliceraldehído 3-fosfato  
deshidrogenada

GH- hormona del crecimiento

GnRH- hormona liberadora de  
gonadotropinas

HVM- Hospital Clínico Veterinario de  
Madrid

IBC- inflammatory breast carcinoma

ml- mililitro

LIVE-1- receptor hialurónico de vasos  
linfáticos

MMAC- mutated in multiple advanced  
cancers

MMP- metaloproteinasas de matriz

LIBC- Lost in Inflammatory Breast Cancer  
gene

PCR- Polymerase Chain Reaction

PECAM- molécula de adhesión endotelial-  
plaquetaria

PEV- Poysee Evolutive

PIGF- factor de crecimiento de placenta

PIK3R1- fosfatidilinositol 3-quinasa, unidad  
reguladora 1

PKC- proteinquinasa C

RA-receptor de andrógenos

RE- receptor de estrógenos

RP- receptor de progesterona

rpm - revoluciones por minuto

SULT- sulfotransferasas

ST- supervivencia total

STS- sulfatasa esteroidea

TGF- factor de crecimiento transformante

TIE2- receptor de células endoteliales con  
actividad proteína quinasa específica

THBS1- trombospondin 1

TMC- tumores mamarios caninos

TLE- tiempo libre de enfermedad

TSP-1- trombospondina

VEGF- factor de crecimiento vascular-  
endotelial

VPF- factor de permeabilidad vascular

VWF- factor von Willebrand



#### ***IV. RESUMEN-ABSTRACT***





#### ***IV. RESUMEN-ABSTRACT***

El término clínico Carcinoma Inflamatorio mamario (CI) se emplea para describir el síndrome producido por un tipo especial de carcinoma mamario localmente avanzado. Caracterizado clínicamente por rápido crecimiento y eritema de la mama, en ausencia frecuentemente de un nódulo mamario, se asemeja a un proceso inflamatorio de la piel. Esta patología mamaria posee características diferenciales desde el punto de vista genético, biológico y de comportamiento clínico con respecto a otros tumores mamarios y está considerada como la neoplasia mamaria más agresiva y de peor pronóstico en la mujer y en la perra.

A partir de 23 muestras de tejido mamario canino se realizó el análisis de la expresión génica del CI canino respecto a tejido mamario sano y carcinomas distintos al CI de la misma especie. Estudiando su expresión mediante Differential Display (DD), método que permite la identificación de nuevos genes y cambios en la expresión génica, y mediante el análisis de genes conocidos candidatos funcionales.

Los perfiles transcripcionales de las muestras de CI, carcinomas no CI y tejido mamario no patológico analizados mediante la técnica de DD mostraban patrones de expresión distintos, identificándose genes implicados en actividades de progresión del ciclo celular, y degradación dentro del sistema ubiquitina-proteosoma entre otros.

También se demostró la expresión diferente en los distintos grupos de muestras, de genes candidatos funcionales que participan en procesos y rutas metabólicas clave en el desarrollo y progresión del CI, como genes implicados en rutas hormonales, relacionados con invasión y metástasis, factores de transcripción, implicados en adhesión celular, transducción de señales y angiogénesis, y genes asociados anteriormente al cáncer de mama.

Estos resultados identifican cambios moleculares significativos en CI que permiten una mejor comprensión de las rutas metabólicas que participan en el desarrollo y progresión de esta patología, y que contribuyen al desarrollo de nuevas dianas terapéuticas.

The term Inflammatory Breast Carcinoma (IBC) is used in a clinical sense to describe a special type of locally advanced human mammary carcinoma. Clinically characterized by a rapid enlargement and erythema in the breast, often without a breast mass, the presentation resembles an inflammatory condition of the skin. IBC has genetics, clinical and pathological different features than other non-inflammatory mammary tumours, and it is considered the most malignant type of mammary cancer, very aggressive and with extremely poor prognosis both in women and bitches.

A total of 23 canine mammary tissue samples were analyzed for gene expression comparing canine CI tissues, healthy tissues and non-inflammatory canine mammary carcinoma. Gene expression was studied by Differential Display (DD), which is a method that allow not only to identify new genes but also the diagnosis of any changes in gene expression, and analyzing functional candidate genes

Transcriptional profiles between canine CI, non-inflammatory canine mammary carcinoma and healthy tissues, measured through DD showed different expression patterns. We identified sequences corresponding to genes implicated in cell progression, protein ubiquitination and others.

We also demonstrated different expression between the samples for several functional candidate genes which are implicated in target process and pathways for IBC development and progression, like genes associated with hormonal pathways, genes related with invasion and metastasis, transcription factors, genes related with adhesion, signal transduction molecules, angiogenesis, and genes directly associated with breast cancer.

This results identify important molecular changes in canine CI which allow us the better understanding about the etiology and progression pathways, and contribute to develop new therapeutic targets.

## ***V. INTRODUCCIÓN***



## **V. INTRODUCCIÓN**

### **1 CÁNCER DE MAMA**

#### **1.1 Glándula mamaria**

La especie canina posee cinco pares de mamas divididos en dos cadenas (derecha e izquierda) que se disponen en filas simétricas bilaterales desde el tórax craneal a la región inguinal y se designan según su localización como torácicas (craneal y caudal), abdominales (craneal y caudal) e inguinales (Frandsen *et al.*, 1988). Están localizadas dentro de la grasa subcutánea en la pared ventral torácica e histológicamente se clasifican como glándulas exocrinas tubuloalveolares compuestas. La unidad secretora se compone de un alveolo y un ducto. Los alveolos están formados por epitelio cúbico simple rodeados de células mioepiteliares que reposan sobre la membrana basal. Los grupos de unidades secretoras forman lobulillos que están separados por septos de tejido conectivo. El conjunto de lobulillos forma un lóbulo glandular. Cada lóbulo posee un conducto galactóforo que drena la secreción de las células conduciéndola hasta la papila mamaria o pezón. Las células mioepiteliares pueden contraerse de manera similar a las células musculares, produciendo la secreción de la leche desde los alveolos hasta los conductos galactóforos. Los conductos galactóforos se dilatan en su porción terminal formando el seno galactóforo que se abre a nivel de la papila mamaria (Junqueira *et al.*, 1996).

Durante la lactación las glándulas mamarias se hipertrofian, producen el calostro y finalmente leche. La secreción normal de las glándulas mamarias consta de una importante cantidad de proteína y gotas lipídicas. Esta secreción tiene baja celularidad, con macrófagos, linfocitos y neutrófilos (Henson *et al.*, 2001).

#### **1.2 Epidemiología del cáncer mamario canino**

Los tumores mamarios son el segundo grupo de neoplasias más frecuentes en la especie canina después de los tumores de piel (Moulton *et al.*, 1999). En las hembras son los tumores más comunes, suponiendo el 52% de todas las neoplasias (Brody *et al.*, 1985). Del 41% al 53% de las neoplasias mamarias son diagnosticadas en hembras como malignas (Rutteman *et al.*, 2000). La incidencia de tumores de mama en machos es del 1% o menor, y normalmente se producen por la secreción de estrógenos por parte de un tumor testicular en las células de Sertoli (Rutteman *et al.*, 2000; Moulton *et al.*, 1999).

La edad media al diagnóstico es de 10 años, no siendo frecuente la aparición de una neoplasia mamaria en perros menores de 4 años (Rutteman *et al.*, 2000). A los 6 años el riesgo de desarrollar tumores mamarios se incrementa (Brody *et al.*, 1985) y parece que después de los 14 años la incidencia de desarrollo de neoplasias mamarias disminuye, aumentando sin embargo la probabilidad de que estas sean malignas (Moulton *et al.*, 1999).

El desarrollo de neoplasias en la glándula mamaria parece ser hormonodependiente ya que el riesgo de padecer tumores mamarios aumenta con cada ciclo estral, siendo del 0,5% para las perras esterilizadas antes del primer estro, 8% para las esterilizadas después del primer ciclo y 26% para aquellas esterilizadas después de 2 o más ciclos. La ovariectomía temprana es una firme protección contra el desarrollo de tumores mamarios (Misdorp *et al.*, 1988; Loar *et al.*, 1989).

Los tumores mamarios benignos aparecen en la vida mas tempranamente que los malignos (Misdorp *et al.*, 1988) y en animales jóvenes a menudo pueden presentarse displasias o hiperplasias. (Pérez-Alenza *et al.*, 2000).

El estudio de la predisposición de padecer neoplasias mamarias según la raza canina parece indicar que las razas Spaniel, Caniche y Dachshunds tienen una elevada incidencia (Henson *et al.*, 2001).

### 1.3 Etiopatogénia

La etiopatogenia de los tumores mamarios caninos (TMC) es multifactorial. La formación tumoral es muy compleja y requiere la acumulación de múltiples alteraciones oncogénicas. Tras el sexo y la edad, el principal factor de riesgo para desarrollar esta enfermedad es una historia familiar positiva, lo que sugiere la existencia de factores genéticos que predisponen al desarrollo de cáncer de mama. Se considera que la proporción de neoplasias mamarias directamente atribuibles a factores hereditarios es de un 5% a un 10% del total (De la Hoya, 2000). Las alteraciones moleculares que van asociadas al desarrollo de los tumores, en su mayoría, muestran una progresión pareja a la progresión histopatológica, que evoluciona desde lesiones incipientes, con grados de displasia y atipia variables, a tumores “benignos”, carcinomas intraepiteliales, tumores infiltrantes y finalmente hacia la diseminación metastásica. La distinción entre benigno y maligno es simple, y conceptualmente errónea en muchos tumores y procesos neoplásicos.

Es un error considerar los procesos tumorales como procesos estáticos, que son definidos por una serie de características descritas en un momento dado y en un contexto anatomopatológico determinado. Desde el punto de vista molecular el proceso carcinogénico se considera más dinámico (Ramón y Cajal, 2000).

Algunos factores hormonales podrían estar involucrados en el desarrollo de tumores mamarios (Battistacci *et al.*, 1974; Hellmén *et al.*, 1993). La administración de progestágenos se asocia con incremento en la aparición de tumores mamarios benignos en la perra (Misdorp *et al.*, 1988; Rutteman *et al.*, 1990; Donnay *et al.*, 1994; Selman *et al.*, 1994). Los tratamientos con estrógenos utilizados para la interrupción de la gestación también aumentan el riesgo de aparición de tumores mamarios (Rutteman *et al.*, 1990; Donnay *et al.*, 1994). Se ha sugerido que los frecuentes episodios de pseudogestación podrían incrementar la aparición de lesiones preneoplásicas (Murrel *et al.*, 1991; Rutteman *et al.*, 1990; Donnay *et al.*, 1994; Selman *et al.*, 1994).

Otros factores que podrían participar en el desarrollo del tejido mamario normal y neoplásico son, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), los factores de crecimiento transformante (TGFs) (Blood *et al.*, 1990; Donnay *et al.*, 1994; Ettinger *et al.*, 1997), el factor tipo insulínico I (IGF-I) y la proteína relacionada a la hormona paratiroidea (PTHrP) (Gilbertson *et al.*, 1983; Okada *et al.*, 1997; Weir *et al.*, 1998). Dichos factores están asociados con la presencia de receptores de estrógenos (RE) y de progesterona (PR) en tumores de glándula mamaria (Rutteman *et al.*, 1989; Gobello *et al.*, 2001). En ciertos tumores mamarios también se han encontrado receptores para glucocorticoides (Parodi *et al.*, 1984) y dihidrotestosterona (D'Arville *et al.*, 1979).

La obesidad y la dieta rica en grasas en los primeros años de vida también han sido asociadas con un peor pronóstico e incremento del riesgo de padecer tumores mamarios respectivamente (Sonnenschein *et al.*, 1991; Kitchell *et al.*, 1995).

En tumores de mama se han identificado múltiples alteraciones cromosómicas que involucran deleciones en los cromosomas 3p, 11p, 13q, 17p y también pérdida de heterocigosis en los cromosomas 1p, 1q, 17q y 18q entre otras, que en algunas ocasiones producen pérdida de los denominados genes supresores (Ramón y Cajal, 2000).

### **1.3.1 Factor hormonal**

Los mecanismos de actuación hormonal sobre la etiología y desarrollo de esta patología no están claros, pero si se sabe que en la glándula mamaria los estrógenos y andrógenos modulan el crecimiento y diferenciación de las células mamarias (Birrell *et al.*, 1998; Liao *et al.*, 2002). La formación de hormonas sexuales en tejidos periféricos, como las glándulas mamarias, está bien documentada en la especie humana (Blankenstein *et al.*, 1999; Maggiolini *et al.*, 2001).

Se han encontrado receptores para estrógenos y progesterona en el tejido glandular mamario normal, en el 70% de los tumores benignos y en el 50% de los tumores malignos (Corrada *et al.*, 2001). Los tumores que no presentan receptores son los más agresivos e

indiferenciados. Además la presencia de receptores es muy poco frecuente en las metástasis, lo que podría indicar un patrón de crecimiento autónomo. Este hallazgo concuerda con la idea de que una alteración en el mecanismo normal de expresión de dichos receptores produciría un progresivo desarrollo de tumores malignos o que la progresión tumoral implica la alteración de su expresión. En la especie humana las neoplasias RE positivas o RE y PR positivas responden al tratamiento endocrino, pero los tumores que carecen de tales receptores no (Mc Guire *et al.*, 1980; Nerurkar *et al.*, 1987; Rooney *et al.*, 1993). Otros análisis de expresión, llevados a cabo con técnicas de PCR a tiempo real, realizados en tumores mamarios de la mujer han encontrado una sobre-expresión del RE  $\beta$  en tumores con pronóstico desfavorable, como aquellos que no responden al tratamiento con Tamoxifeno (Iwao *et al.*, 2000). Sin embargo otros estudios de detección de RE  $\beta$  con RT-PCR hablan de su menor expresión en tumores mamarios respecto a tejido mamario sano (Speirs *et al.*, 1999).

La expresión inmunohistoquímica en la especie humana del receptor de andrógenos ofrece resultados contradictorios respecto al porcentaje de expresión, relación con el tipo histológico, pronóstico y correlación con otros receptores esteroideos (Illera *et al.*, 2003). Y no está claro el mecanismo por el cual los andrógenos ejercen su acción en la glándula mamaria, pudiendo realizarse de manera directa sobre el receptor de andrógenos, o de forma indirecta mediante su conversión en estradiol (Maggiolini *et al.*, 1999).

La mayor parte de estrógenos circulantes se encuentran en forma de sulfato de estrona (SO<sub>4</sub>E1) cuyos niveles séricos son 10 veces superiores a los niveles de estrógenos no conjugados como el 17 $\beta$ -estradiol o la estrona (Pascualini *et al.*, 1986; Dao *et al.*, 1974), y cuya concentración es de 10 a 40 veces superior en el tejido de una neoplasia mamaria que en el suero en la especie humana (Pascualini *et al.*, 1989). La importancia de la ruta metabólica mediada por la estrona sulfotransferasa en tumores mamarios humanos ha sido sostenida por distintos autores los cuales encontraron concentraciones mayores de estrona sulfato en tejidos neoplásicos mamarios que en tejido mamario sano (Edery *et al.*, 1981; Pascualini *et al.*, 1996).

### **1.3.2 Factor de Crecimiento Insulínico tipo I**

El factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I) se sintetiza en el hígado y se encuentra en la circulación unido a proteínas transportadoras. En los tejidos se hallan los receptores para IGF-I que, al unirse al ligando inician una serie de reacciones bioquímicas que finalmente desencadenan la proliferación celular sin intervención del circuito REs o bien, simultáneamente, con el mismo.



### **1.3.3 Prolactina y Hormona del crecimiento**

El papel desempeñado por las hormonas hipofisarias en la tumorigénesis mamaria es controvertido. La prolactina y hormona del crecimiento (GH) estimulan el desarrollo y diferenciación de la glándula y también la lactogénesis (Rutteman *et al.*, 1989; Rutteman *et al.*, 1995; Gobello *et al.*, 2001). La secreción de GH inducida por la progesterona podría influenciar el desarrollo de tumores, que ocurriría por la proliferación de células epiteliales mamarias susceptibles (Hampe *et al.*, 1974; Rutteman *et al.*, 1989; Ettinger *et al.*, 1997; Hahn *et al.*, 2001). Las mamas neoplásicas producen, a su vez, GH que autoperpetuaría su desarrollo (Corrada *et al.*, 2002).

El riesgo de desarrollar un tumor mamario es más elevado para las perras que han presentado muchas pseudogestaciones, aunque este aumento del riesgo podría ser secundario a la asociación del efecto de la edad y a la acumulación de productos de secreción dentro de la mama, ya que estos productos no se eliminan como en la lactancia fisiológica. Habría una combinación de hipoxia ligada a la distensión de los acinos, liberación de radicales libres carcinogénicos y acúmulo de productos carcinogénicos de origen alimenticio o derivados de la degradación de la misma leche. Estos productos estarían en un contacto prolongado con el epitelio mamario y podrían inducir lesiones preneoplásicas o influenciar la evolución de lesiones preexistentes. La prolactina jugaría un papel indirecto por inducción a la pseudogestación (Corrada *et al.*, 2001).

### **1.3.4 Metaloproteinasas**

Las metaloproteinasas de matriz (MMPs) juegan un papel fundamental en los mecanismos de degradación durante los procesos de invasión y metástasis ya que participan en la degradación de la matriz extracelular. Además se ha encontrado una asociación positiva entre la elevada expresión de dichas enzimas en tumores mamarios caninos y el grado de malignidad (Yokota *et al.*, 2001; Hirayama *et al.*, 2002; Papparella *et al.*, 2002).

### **1.3.5 Ciclooxygenasa 2 (COX-2)**

Las enzimas ciclooxygenasas COX-1 y COX-2 catalizan la formación de prostaglandinas a partir de ácido araquidónico, desempeñando un papel importante en distintos procesos fisiológicos y patológicos. Aumentos en la expresión de COX-2 se han asociado con distintos cánceres humanos, incluido neoplasias mamarias (Singh *et al.*, 2002). También se ha observado que inhibidores selectivos de COX-2 como celecoxib y nimesulide reducen la incidencia,

multiplicidad y volumen del tumor (Harris *et al.*, 2000; Nakatsugi *et al.*, 2000). COX-2 se encuentra expresado inmunohistoquímicamente en una proporción significativa de TMC, sin embargo tumores menos agresivos como los adenomas expresan en menor proporción COX-2 (un 24%) frente a un 56% de los tumores malignos (Doré *et al.*, 2003).

### **1.3.6 Moléculas de adhesión**

Las moléculas de adhesión celular facilitan la adhesión entre células de forma específica. Resultan de importancia porque la génesis y desarrollo de las metástasis depende, entre otros factores, de la integridad o ruptura de las proteínas que la célula metastásica encuentra en su movilidad (Rochefford *et al.*, 1992). Conjuntamente con otras proteasas (colagenasa, metaloproteinasas, etc.) la cathepsina D ha pasado a ser un marcador de recurrencia y metástasis en las neoplasias. Su aumento se asocia con mayor fluidez extracelular por proteólisis de cadherina, actina, vinculina y otras moléculas de adhesión celular.

Se han encontrado alteraciones en tumores de mama de diversos tipos de colagenasa y en la expresión de moléculas de adhesión como el DCC, CD44 y E-cadherina (Ramón y Cajal, 2000). Un factor involucrado en la progresión tumoral en los tumores mamarios caninos es la pérdida de una molécula denominada E-cadherina, perteneciente a la familia de moléculas de adhesión celular (CAM). En algunos tumores mamarios caninos se modifica la cantidad o naturaleza de la E-cadherina de su superficie celular lo cual afecta muchos aspectos de la adhesión intercelular y la migración celular, así las metástasis de células tumorales se asocian con la pérdida de cadherina de superficie celular (Restucci *et al.*, 1997; Brunetti *et al.*, 2003; Sarli *et al.*, 2004).

También destacan los estudios de expresión de diversos componentes de la familia de las integrinas (en especial  $A_2$  y  $B_1$ ) que son receptores de membrana y median la adhesión intercelular y la adhesión con la matriz extracelular. La disminución de la expresión de  $A_2$  y  $B_1$  se ha asociado a peor pronóstico y a mayor invasividad de las células tumorales (Ramón y Cajal, 2000).

### **1.3.7 Colesterol**

La vinculación entre el colesterol y la biología tumoral se estableció hace tiempo, cuando se observó que ciertas células neoplásicas sintetizaban grandes cantidades de colesterol. Más tarde, se comprobó que la principal enzima reguladora de la síntesis de colesterol, la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa), se encontraba significativamente aumentada en los tejidos tumorales (Alonso *et al.*, 1998). Las células tumorales tienen una demanda mayor de colesterol y sus moléculas precursoras, que las células normales. La enzima

HMG-CoA reductasa interviene en la duplicación celular proporcionando cantidades suficientes de colesterol para la conservación de la integridad de las membranas celulares y activando la ADN polimerasa, enzima de la cual depende la síntesis del ácido desoxirribonucleico (ADN). La observación de que en animales de experimentación el descenso del colesterol en sangre, inducido por la dieta o por tratamiento con fármacos, disminuye el crecimiento de la masa tumoral, corrobora que la inhibición de la biosíntesis del colesterol representa una estrategia atractiva para bloquear procesos relacionados con la transformación neoplásica (Gómez *et al.*, 1998). La lovastatina es un antibiótico fúngico que inhibe de forma competitiva la actividad de la HMG-CoA reductasa porque su estructura es semejante al sustrato. Las propiedades de la lovastatina no se limitan a sus efectos sobre la proliferación de las células tumorales puesto que también se comporta como un potente inhibidor de los procesos de adhesión, migración e invasión.

### **1.3.8 Sistema inmune**

La función inmune alterada puede jugar un papel importante en la patogénesis de las neoplasias mamarias en la especie canina. Se han identificado antígenos no tumorales específicos que causan una inefectiva respuesta inmune humoral y celular. Los complejos inmunes identificados en perras con tumores mamarios generalmente impiden ejercer la respuesta inmune antitumoral (Misdorp *et al.*, 1988).

### **1.3.9 Oncogenes**

Todos aquellos genes cuya activación/inactivación constitutiva lleve a un aumento de la proliferación celular, altere el control del ciclo celular, interfiera con la diferenciación celular o estén involucrados en la muerte celular programada o apoptosis son potencialmente oncogénicos. Además hay que añadir todos aquellos cambios moleculares que se pueden heredar por línea germinal y predisponer a diversos tipos de cánceres, y a los mecanismos de carcinogénesis como deficiencias en el control de reparación del ADN, que se pueden asociar con el desarrollo de tumores (Ramón y Cajal, 2000).

La descripción de oncogenes y genes supresores de tumores se basa en la capacidad transformante que confieren los oncogenes, y la pérdida de función de la actividad supresora de los genes supresores. Hay más de 100 oncogenes con capacidad transformante *in vitro*, y la mayoría está relacionados con el ciclo celular, la proliferación celular, factores de crecimiento, rutas de transmisión de señales, o involucran a genes cuya pérdida de control o actividad implica ventajas de crecimiento que normalmente confieren la actividad transformante (Ramón y Cajal,

2000). Presentes en la célula normal como proto-oncogenes, se encargan a través de las correspondientes proteínas que codifican, de gobernar la replicación y la diferenciación celular. Sin embargo cuando estos genes reguladores del crecimiento se activan de manera inapropiada dirigen las células hacia la división incontrolada.

El oncogen c-erbB-2 se encuentra en cánceres mamarios y ováricos. Su expresión se asocia a un elevado índice mitótico y se correlaciona con una respuesta clínica a la quimioterapia baja. El oncogen c-erbB-2 codifica una forma alterada y truncada de un receptor de membrana de factores de crecimiento con actividad intrínseca tirosina quinasa que lleva acabo autofosforilaciones que transmiten señales intracelulares de proliferación (Gómez *et al.*, 1998). El c-erbB-2 fue mapeado en la especie canina mediante FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) y fue ubicado en el cromosoma 1q13.1. Su expresión está asociada a una rápida progresión y mal pronóstico en cáncer de mama en perras (Murua Escobar *et al.*, 2001).

### **1.3.10 Genes supresores de tumores**

Los genes supresores de tumores son genes que codifican proteínas que modulan el ciclo celular a través de un efecto inhibitorio sobre la progresión del mismo.

El gen p53 codifica una fosfoproteína que regula la replicación del ADN, la proliferación celular y la muerte celular, e impide la propagación de células dañadas genéticamente. Las mutaciones en p53 contribuyen a incrementar alteraciones citogenéticas y formación de tumores (Veldhoen *et al.*, 1999). Se han detectado mutaciones de p53 hasta en el 16% de los adenocarcinomas *in situ* de mama en la especie humana, indicando que puede ser una alteración precoz en el desarrollo del cáncer de mama, ajustándose al modelo de carcinogénesis secuencial con acumulación progresiva de alteraciones oncogénicas (Ramón y Cajal, 2000).

Otro gen involucrado en la etiopatogenia tumoral es el BRCA1, productor de una fosfoproteína que participa en la regulación del ciclo celular. La pérdida de la expresión de BRCA1 está asociada con una alta proliferación del marcador Ki-67 y RE  $\alpha$ , y la reducción y distribución de BRCA1 en tumores mamarios caninos con características de malignidad histológica (Tsuchida *et al.*, 2001; Nieto *et al.*, 2003). También se ha descrito pérdida de heterocigosis en la región Hsa 13q12-13 en más de un 50% de los carcinomas esporádicos, región donde se encuentra BRCA2 y el gen del retinoblastoma (Ramón y Cajal, 2000).

La proteinquinasa C (PKC) pertenece a una familia de proteínas quinasas que fosforilan aminoácidos serina y treonina en una gran variedad de proteínas. La importancia de la PKC radica en su implicación en los mecanismos de transducción de señales de algunos receptores hormonales y factores de crecimiento.

Otras alteraciones oncogénicas que se están estudiando en cánceres de mama son la ciclina D/PRAD1 y la expresión de Bcl-2. El gen Bcl-2 codifica una proteína mitocondrial relacionada con la apoptosis. Su positividad se asocia en cánceres de mama con mejor pronóstico y positividad para los receptores estrogénicos (Ramón y Cajal, 2000).

La fosfatasa supresora de tumores es un gen supresor de tumores, denominada también PTEN “phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten” o MMAC “mutated in multiple advanced cancers”. La mutación de PTEN fue publicada en el año 2006 en tumores mamarios caninos (Kanae *et al.*, 2006).

Numerosos estudios epidemiológicos han sugerido que los individuos portadores de un alelo mutado del gen responsable del síndrome Ataxia Telangiectasia (ATM) tiene una mayor predisposición a desarrollar tumores, especialmente el de mama (Swift *et al.*, 1978; Pippas *et al.*, 1988; Borrasen *et al.*, 1990). Sin embargo, existe controversia respecto a la importancia del gen ATM en el desarrollo de neoplasias mamarias.

Las galectinas constituyen una familia de proteínas conservadas a través de la evolución que participan en diversas funciones biológicas. Esta familia está implicada en procesos inflamatorios agudos y crónicos, adhesión celular, proliferación y diferenciación, apoptosis, progresión tumoral y regulación del *splicing* alternativo. La mayoría de estas funciones biológicas han sido asignadas a galectina-1 (Gal-1) y galectina-3 (Gal-3) (Goldstone *et al.*, 1991; Rabinovich *et al.*, 2004). En perras con tumores mamarios malignos se ha observado que la progresión tumoral fue asociada con la pérdida de la expresión de Gal-3 (Choi *et al.*, 2004).

### **1.3.11 Ciclo celular**

La familia de proteínas denominadas ciclinas tiene un papel fundamental en la regulación del ciclo celular, activando las distintas fases del ciclo celular. La mayoría de las células son capaces de proliferar en base a estímulos externos tales como factores de crecimiento y hormonas que actúan a través de receptores de superficie celular. Las ciclinas se combinan, activan y dirigen la acción de unas proteínas especializadas llamadas tirosina quinasas dependientes de ciclinas (CDK) (Bird *et al.*, 2002), y son categorizadas dentro de 3 grupos: Tipo A, Tipo B y Ciclinas G1 (ciclinas C, D, E).

En el ciclo celular hay varios puntos de control llevados a cabo por complejos formados por ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas (CDK). Las CDK son quinasas que fosforilan diversos sustratos involucrados en la progresión del ciclo celular, actuando como las unidades catalíticas del complejo. Las ciclinas actuarían como unidades regulatorias. Diversos estudios han

demostrado una asociación entre la expresión de distintas ciclinas y el cáncer mamario canino (Murakami *et al.*, 2000; Sfacteria *et al.*, 2003).

### **1.3.12 Angiogénesis tumoral**

En los tumores, la proliferación de vasos de neoformación es un proceso necesario para el crecimiento tumoral. Varias moléculas son necesarias para promover la angiogénesis en tejidos normales, pero la más importante que controla la morfogénesis de los vasos sanguíneos es el factor de crecimiento vascular-endotelial (VEGF-A) o factor de permeabilidad vascular (VPF). VEGF-A forma parte de una familia de reguladores angiogénicos que incluye al factor de crecimiento de placenta (PIGF), VEGF-B, VEGF-C y VEGF-D (Ferrara *et al.*, 2003; Shibuya *et al.*, 2006).

VEGF-A aparece como un poderoso factor angiogénico en tumores mamarios caninos (Graham *et al.*, 1999; Restucci *et al.*, 2002; Restucci *et al.*, 2004). Se han identificado receptores para VEGF-A en tumores mamarios caninos benignos y malignos mediante técnicas inmunohistoquímicas (Restucci *et al.*, 2002; Restucci *et al.*, 2004).

VEGF-C y VEGF-D son importantes reguladores de la linfangiogénesis (Karkkainen *et al.*, 2004; Baldwin *et al.*, 2005).

### **1.3.13 Telomerasa**

Otro de los mecanismos por los cuales los tumores mamarios progresan involucra a los telómeros. Cuando los telómeros de los cromosomas se acortan hasta cierta longitud transmiten instrucciones a la célula para su autodestrucción, suministran así un mecanismo para que el cuerpo elimine células envejecidas. En la mayoría de las células normales falta la telomerasa, pero en el cáncer es activa y bloquea el acortamiento de los telómeros. En consecuencia, las células cancerosas no mueren.

La actividad telomerasa ha sido detectada en tumores mamarios caninos (Funakoshi *et al.*, 2000; Argyle *et al.*, 2003). Algunas de las estrategias contra la telomerasa se basan en la identificación de agentes que inhiban la actividad de la telomerasa. El 3'-azido-2', 3'-dideoximidina (AZT) es un inhibidor de la transcriptasa inversa, y ha mostrado inhibir la actividad telomerasa en células tumorales (Gómez *et al.*, 1998).

### **1.3.14 Metástasis**

El proceso de metástasis consiste en la diseminación a órganos distantes de un tumor primario por vía sanguínea o linfática. En general, cuanto mas agresivo es el tumor primario, mas rápido crece y es más probable que metastatice, aunque existen excepciones. Algunas lesiones bien diferenciadas de crecimiento lento a veces metastatizan y a la inversa, lesiones de crecimiento rápido permanecen localizadas durante años.

A pesar de los avances en el diagnostico temprano, técnicas quirúrgicas, terapias adyuvantes o neoadyuvantes, la mayoría de los pacientes mueren como resultado de las metástasis, las cuales son resistentes a las terapias convencionales (Fidler *et al.*, 1978). La excisión quirúrgica del tumor primario no es curativa en muchos pacientes porque en ese momento la metástasis ya ha ocurrido (Sugarbaker *et al.*, 1979). Las metástasis pueden estar localizadas en diferentes órganos y/o en diferentes regiones de un mismo órgano. La estructura y función del órgano afectado condiciona significativamente la respuesta de la terapia contra las células tumorales (Fidler *et al.*, 1995), ya que las drogas antitumorales deben llegar al foco en cantidades suficientes para destruir las células tumorales sin producir efectos colaterales en el resto de los órganos.

Las neoplasias contienen múltiples subpoblaciones de células con diferentes características genéticas, bioquímicas, inmunológicas y estructurales (Fidler *et al.*, 1978; Fidler *et al.*, 1982; Nicolson *et al.*, 1984; Heppner *et al.*, 1984; Fidler *et al.*, 1990; Fidler *et al.*, 1995; Radinsky *et al.*, 1996). Esta heterogeneidad es también prominente dentro y entre las metástasis (Fidler *et al.*, 1985; Radinsky *et al.*, 1996).

### **1.3.15 Factores epigenéticos**

El control genético de la expresión de distintas enzimas y componentes de la membrana celular es muy complejo y poco conocido, en parte mediado por factores epigenéticos locales que controlan y regulan la expresión de los mismos. En estadios avanzados así como en lesiones infiltrantes las alteraciones moleculares que impulsan la agresividad celular no sólo dependen de las propias células tumorales sino que también las células mesenquimales pueden condicionar en gran medida la expresión de los genes imprescindibles para la adquisición de un fenotipo invasivo y metastatizante (Ramón y Cajal, 2000).

## 1.4 Síntomas clínicos

La presentación clínica de los tumores mamarios caninos es muy variable, pudiendo ser únicos o múltiples. En los casos múltiples pueden ser del mismo o diferente tipo histológico.

Podemos observar uno o varios nódulos en glándula mamaria o cadena mamaria en más de un 50% de los perros con neoplasias mamarias. Un 60-70% de los nódulos aparecen en el 4° o 5° par mamarios, debido posiblemente a que son las mamas caudales las que contiene mayor cantidad de tejido mamario (Kurzman *et al.*, 1986). El tamaño de los tumores mamarios es muy variable, desde unos pocos milímetros hasta varios centímetros. Se presentan como nódulos aislados o múltiples dentro de la glándula mamaria y pueden o no asociarse con el pezón. Es frecuente encontrar secreciones anormales en pezones de las mamas afectadas.

Las perras con tumores mamarios benignos generalmente son asintomáticas. Pueden presentarse signos clínicos de neoplasia mamaria debido a la molestia ocasionada por el crecimiento de la masa, que incluye excesivo lamido de la masa, dificultad para acostarse, y resistencia a la manipulación del área abdominal (Jordan *et al.*, 1998).

Los síntomas clínicos pueden estar provocados por las metástasis, como el aumento de tamaño de linfonódulos regionales (axilares o inguinales) en caso de metastatización desde la neoplasia primaria hasta los linfonódulos (Rutteman *et al.*, 2000). Las metástasis en las neoplasias mamarias se producen vía hematógena y/o linfática (Theilen *et al.*, 1987; Weiss *et al.*, 1990).

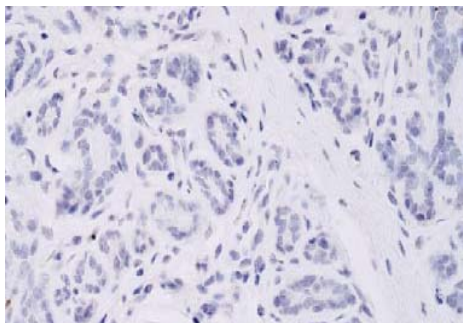
## 1.5 Patología

Aproximadamente el 50% de las neoplasias mamarias caninas son benignas. El adenocarcinoma es el tipo histológico maligno más común en los tumores mamarios caninos (Nelson *et al.*, 1995). Es importante considerar que los tumores mamarios caninos pueden presentar múltiples tipos histológicos concurrentemente (Brodey *et al.*, 1983; Allen *et al.*, 1989).

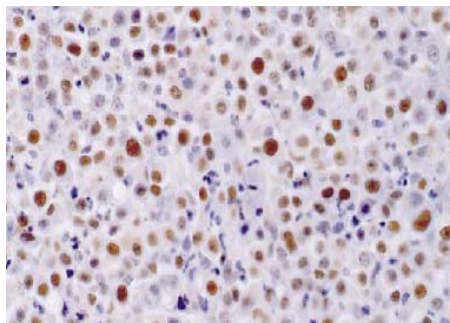
El grado de malignidad histológica usualmente se expresa en una escala de 1 a 3 grados, donde el grado 3 tiene los peores pronósticos (Jubb *et al.*, 1970; Hampe *et al.*, 1974; Misdorp *et al.*, 1988; Dhame *et al.*, 1989). La transformación maligna celular está relacionada con la activación de diversos oncogenes y la inactivación de genes supresores. En dicho proceso de transformación celular va implícito el fallo de las células al diferenciarse y la activación de vías celulares que inducen proliferación (Hunter *et al.*, 1997).



Los tejidos mamarios sanos al igual que la mayoría de tumores mamarios benignos expresan receptores de estrógenos y progesterona. Sin embargo menos del 50% de los carcinomas mamarios expresan estos receptores.



**Figura V.1.1.** Glándula mamaria normal



**Figura V.1.2.** Adenocarcinoma sólido positivo para el Antígeno de proliferación nuclear (APN). Inmunohistoquímica para APN Bar=80μm.

## 1.6 Diagnóstico

La biopsia escisional y su posterior estudio histopatológico es el método de elección para confirmar el diagnóstico. Evidencias histológicas de malignidad no siempre implican un curso clínico agresivo (Tvedten *et al.*, 1999). El examen citológico de especímenes obtenidos mediante aspiración por aguja fina suele rendir resultados ambiguos.

La radiología, la ecografía y la palpación minuciosa permiten evaluar metástasis a distancia.

## 1.7 Tratamiento

### 1.7.1 Manejo Clínico

Antes de comenzar el tratamiento se debe realizar una historia clínica completa que recoja edad, ovariectomía y la edad de la mima, fecha del último estro, gestaciones y tratamientos hormonales, fecha de aparición de los nódulos, y velocidad de crecimiento de los mismos. También es necesaria una exploración física minuciosa. Una vez terminada la exploración general se procede a la evaluación de las glándulas mamarias y nódulos linfáticos regionales (axilar e inguinal).

Los test laboratoriales deben incluir hemograma y perfil bioquímico. Son necesarias pruebas de coagulación cuando existe alto riesgo de metástasis, ya que va asociado con riesgo de coagulación vascular diseminada. Radiografías torácicas, incluidas las dos vistas laterales, deben

realizarse para revisar la aparición de metástasis pulmonares. La radiología abdominal también es útil para detectar adenopatías sublumbares.

Las metástasis suelen observarse en nódulos linfáticos regionales, así que debe realizarse una exploración de los mismos mediante palpación y/o aspiración con aguja fina si es posible (Ruttermann *et al.*, 2000).

### **1.7.2 Cirugía**

La cirugía es el método de elección para las neoplasias mamarias caninas, salvo en presencia de enfermedad metastásica o carcinoma inflamatorio. Las técnicas incluyen nodulectomía, mastectomía, mastectomía en bloque, y mastectomía radical unilateral o bilateral (Wilkinson *et al.*, 1971; Withrow *et al.*, 1975). La exéresis de los nódulos linfáticos regionales esta indicada si el examen citológico de los mismos revela la presencia de células tumorales.

No existe una aceptación unánime acerca de si la castración aporta beneficios en la perra con tumores mamarios. Hay trabajos que muestran una supervivencia mayor cuando la ovariectomía se realiza conjuntamente con la mastectomía (Sorenmo *et al.*, 2000), mientras que otros no observan beneficio alguno (Schneider *et al.*, 1969; Yamagami *et al.*, 1996).

### **1.7.3 Quimioterapia**

Los fármacos quimioterápicos se administran en pacientes que presentan un alto riesgo de metástasis. Los protocolos incluyen doxorubicina, combinaciones de ciclofosfamida oral, vincristina y metotrexato (Harvey *et al.*, 1977; Hahn *et al.*, 2001).

### **1.7.4 Radioterapia**

La radioterapia puede emplearse como terapia adyuvante postquirúrgica, en el tratamiento de tumores inoperables o en metástasis óseas (Mc Leod *et al.*, 1999; Ruttermann *et al.*, 2000). Se aplica antes o después de la resección quirúrgica de un tumor. La radiación a menudo fracasa en el centro del tumor, donde existen grandes volúmenes de células muchas en condiciones de hipoxia, pero rara vez falla en la periferia, donde las células están en cantidades reducidas y bien vascularizadas (Mc Leod *et al.*, 1999).

### 1.7.5 *Tratamientos Hormonales*

La síntesis de compuestos agonistas o antagonistas de los receptores nucleares ha llevado al desarrollo de drogas que actualmente son usadas como contraceptivos o potencialmente útiles en el tratamiento y prevención del cáncer de mama en la especie canina.

- **Antiestrogénicos**

En medicina humana, el uso de antiestrógenos en carcinomas mamarios con receptores de estrógenos positivos es rutinario, sin embargo, en la perra los antiestrógenos tienen un efecto agonista sobre el aparato genital que limita severamente su uso (Morris *et al.*, 1993; Hoffmann *et al.*, 2000). Este es el caso del tamoxifeno (antiestrógeno no esteroide), el cual presenta potentes y beneficiosos efectos antitumorales (inhibición de proteínas quinasas A y C, inhibición de calmodulina -canales de calcio-, modificaciones de la fluidez de la membrana plasmática de las células tumorales, estimulación de las fosfolipasas, inhibición de P-glicoproteína, inhibición de angiogénesis, estimulación de la apoptosis, regulación de factores de crecimiento), pero a su vez posee efectos netamente estrogénicos en la hembra canina, que cuestionan fuertemente su extrapolación.

- **Antiprogestágenos**

Los competidores de los receptores de progesterona como el onapristone, el mifepristone y el ZK 112.993 demostraron ser potentes inhibidores de los tumores mamarios y sus metástasis en roedores (Schneider *et al.*, 1992; Montecchia *et al.*, 1999; Vanzulli *et al.*, 2005), en líneas celulares humanas (Schneider *et al.*, 1990) y en pacientes humanos con metástasis (Maudelonde *et al.*, 1987; Michna *et al.*, 1989; Bakker *et al.*, 1990; Horwitz *et al.*, 1992). No existen, en la hembra canina, estudios similares usando antiprogestágenos.

El aglepristone es un bloqueante de los RP disponible en el mercado veterinario mundial. En la perra, el aglepristone compite con los receptores uterinos para la progesterona con una tasa de fijación tres veces mayor que la hormona endógena sin tener actividad antiglucorticoide (Philibert *et al.*, 1994).

- **Antiprolactínicos**

En ocasiones los tumores de glándula mamaria se presentan conjuntamente con pseudogestación. En este caso, el manejo con drogas antiprolactínicas está indicado para permitir la evaluación detallada del tumor antes de la cirugía (Murrell *et al.*, 1991).

- **Agonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas**

Los agonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), cuando son utilizados a dosis sostenidas en el tiempo, inhiben reversiblemente el eje gonadal después de un corto período de estimulación. Esta inhibición es producida por la menor regulación de los receptores de GnRH en la glándula pituitaria anterior (McRae *et al.*, 1985). La goserelina, fármaco agonista GnRH, se ha usado satisfactoriamente en perras con tumores mamarios (Lombardi *et al.*, 1999).

#### **1.7.6 Inmunoterapia**

Su finalidad es la de estimular el sistema inmune para permitir la inhibición del crecimiento tumoral. Se ha logrado mejores resultados cuando la masa tumoral se reduce previamente con alguno de los métodos anteriores. La estimulación del sistema inmune puede realizarse con levamisol (Harvey *et al.*, 1977). Otros estudios no han logrado demostrar efectos favorables (Mc Ewen *et al.*, 1996).

#### **1.7.7 Otros**

- ❖ **Inhibidores proteicos**

Aunque la invasión tumoral determina la agresividad biológica y la progresión de la enfermedad, la mayoría de las estrategias terapéuticas tradicionales se basan en la inhibición de la proliferación o en la destrucción de las células neoplásicas, pero no en la reducción de sus propiedades invasivas. Se ha desarrollado un grupo de inhibidores sintéticos de metaloproteinasas (MMPs) que actualmente son evaluados en estudios preclínicos. Entre ellos debemos destacar el BB-94 o batimastat, que inhibe las MMPs al ocupar el sitio del Zn en la enzima, y ciertas tetraciclinas modificadas (doxiciclina, minociclina), cuyo mecanismo de acción exacto se desconoce (Gómez *et al.*, 1998).

### ❖ Inhibidores de la biosíntesis de colesterol

Las acciones antitumorales de la lovastatina en modelos experimentales animales de carcinoma mamario se han observado incluso a dosis relativamente bajas. La utilidad de la lovastatina, así como el de estrategias alternativas que reduzcan la síntesis del colesterol, en el tratamiento del cáncer mamario, podría extenderse hacia el terreno preventivo (Gómez *et al.*, 1998).

### ❖ Inhibidores de erbB-2

El elevado número de receptores erbB-2 en tumores mamarios humanos (entre un 25-30% presentan la sobre-expresión del receptor) ha llevado a utilizar esta molécula como diana en el tratamiento. Distintas drogas han mostrado ser efectivas en bloquear la señalización originada en la célula por este receptor. La estrategia de intentar bloquear los receptores mediante el empleo de anticuerpos anti-receptores ha sido frecuentemente empleada *in vitro*, pero en el caso de trastuzumab, se ha llegado a estudios clínicos satisfactorios con pacientes humanos. Todavía no se cuenta con estudios de este tipo en veterinaria.

### ❖ Control del ciclo celular

Existen distintas estrategias terapéuticas en estudio, como bloqueantes de la interacción CDK-ciclinas, bloqueo de la fosforilación, inhibición de síntesis de ciclinas, activación de la degradación de ciclinas y inhibición de moléculas CDK.

### ❖ Agentes anti-invasivos o anti-metastásicos

La desmopresina, (DDAVP, 1-diamino-8-D-arginina vasopresina) es un péptido sintético análogo a vasopresina con propiedades procoagulantes y profibrinolíticas que actúa previniendo la diseminación metastásica regional y a distancia. En un estudio realizado en la especie canina se encontraron diferencias en la aparición de metástasis entre un grupo tratado con DDAVP y el control, de 87% y 12% respectivamente, reduciendo significativamente la progresión y la muerte de animales con tumores malignos durante el periodo de estudio (Giron *et al.*, 2002).

## 1.8 Pronóstico

Entre los factores pronóstico de pacientes con tumores mamarios caninos encontramos:

➤ **Factores clínicos**

- **Edad:** los animales de edad avanzada tienen mayor probabilidad de desarrollar TMC y además un peor pronóstico.
- **Localización y número de neoplasias:** parece que la localización no influye, pero sí el número, pues a mayor número de TMC malignos menor tiempo libre de enfermedad (TLE).
- **Estadio clínico:** basado en el tamaño tumoral, afección de nódulos linfáticos y existencia de metástasis a distancia, está relacionado con la supervivencia total (ST).
- **La implicación de nódulos linfáticos:** predice un mayor riesgo de metástasis y acorta la ST.
- **El ritmo y tipo de crecimiento** se ha relacionado con un peor pronóstico cuando es rápido e invasivo.
- **El tamaño del tumor** es un buen factor pronóstico puesto que la presencia de, al menos un tumor maligno, de gran tamaño está relacionada con menor TLE y ST.
- **La ulceración** de la piel indica que se trata de una lesión de peor pronóstico.

➤ **Factores histológicos**

El tipo histológico es otro factor que influye en el pronóstico (Kurzman *et al.*, 1986). Los tumores benignos se tratan con facilidad mediante escisión quirúrgica y por lo general tienen mejor pronóstico. Los tumores menos invasivos y mejor diferenciados tienen bajas recurrencias, al igual que aquellos en los que existe baja reactividad linfoide (Loar *et al.*, 1989).

➤ **Otros factores pronóstico**

Se ha observado en la especie humana que pacientes en el mismo estadio de la enfermedad tienen distinta respuesta al tratamiento y distinto pronóstico en general. Factores pronósticos de metástasis como el tamaño de los nódulos linfáticos o el tipo histológico fallan a la hora de clasificar con exactitud su comportamiento clínico (McGuire *et al.*, 1991; Goldhirsch *et al.*, 1998; Eifel *et al.*, 2001). Por esto se han desarrollado técnicas de análisis mediante microarrays que permiten conocer la expresión de una batería de genes implicados en el desarrollo y progresión de las neoplasias mamarias. El estudio de las diversas alteraciones moleculares existentes en relación con la estirpe celular transformada pueden ayudar a establecer a medio plazo pronósticos más reales (Ramón y Cajal, 2000). Estos análisis se comercializan desde Marzo de 2007 con el nombre de Mamaprint y analizan la expresión de 70 genes relacionados con el cáncer de mama en la especie humana.

## 2 CARCINOMA INFLAMATORIO MAMARIO

El término clínico Carcinoma Inflamatorio Mamario (CI) describe un tipo especial de tumor mamario localmente avanzado. Designado como TNM 4d y estadio IIIB o IV, la *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) define al carcinoma inflamatorio mamario como una entidad clinicopatológica caracterizada clínicamente por el edema difuso y eritema de la mama, en ausencia frecuentemente de un nódulo mamario.

Los principales estudios acerca del CI se han llevado a cabo en la especie humana.

### 2.1 Historia

Esta patología fue descrita por primera vez en la mujer en 1814 por Sir Charles Bell, en su libro *A System of Operative Surgery*. Desde entonces ha recibido distintos nombres: mastitis carcinomatosa, carcinoma mamario agudo, linfocitoma de mama, cáncer de mama, cáncer encefaloide agudo, carcinomatosis mamaria aguda y cáncer de lactación (von Volkmann *et al.*, 1875; Klotz *et al.*, 1869; Leitch *et al.*, 1909; Learmonth *et al.*, 1916; Schumann *et al.*, 1916; Lee *et al.*, 1924).

Los primeros en utilizar el término “carcinoma inflamatorio mamario” fueron Lee y Tannenbaum en 1924, proporcionando además una clara descripción clínica de la enfermedad. En 1938 Taylor y Meltzer describieron la patología como una presentación del cáncer de mama única, agresiva y fatal que puede afectar a las mujeres de cualquier edad y de presentación no restringida a la lactación o embarazo. Desde entonces muchos investigadores han confirmado la malignidad del carcinoma inflamatorio mamario.

En la perra fue descrito por primera vez en 1983 en un estudio clínico y anatomopatológico de 10 animales con carcinoma inflamatorio mamario canino (Susaneck *et al.*, 1983). En 2003 Pérez-Alenza *et al.* realizaron un trabajo que investiga las características epidemiológicas, clínicas, histológicas e inmunohistoquímicas de 33 casos de carcinoma inflamatorio mamario canino.

### 2.2 Epidemiología

Es un tumor poco frecuente que en la mujer puede llegar a afectar al 2% de todos los tumores mamarios malignos (Brooks *et al.*, 1998) y reseña menos del 5% de todos los tumores mamarios diagnosticados (Chang *et al.*, 1998). En España el 2,9% de todos los cánceres mamarios

humanos diagnosticados entre 1977 y 1993 en el Instituto Valenciano de Oncología se correspondieron con carcinomas inflamatorios mamarios (Ruiz Simón *et al.*, 2000).

El CI se presenta en mujeres más jóvenes que otros tumores mamarios, frecuentemente en estado pre o perimenopáusico (Chang *et al.*, 1998; Anderson *et al.*, 2003; Charafe-Jauffret *et al.*, 2004; Hance *et al.*, 2005), con una rápida progresión de la enfermedad (dentro de los 6 meses) asociada a los síntomas clínicos característicos. Su incidencia aumenta hasta los 50 años y luego descende (Anderson *et al.*, 2005). El CI también puede presentarse en varones, con una tasa del 1,4% respecto de todos los tumores mamarios diagnosticados (Anderson *et al.*, 2005).

El CI parece estar asociado con embarazo y lactación (Koltz *et al.*, 1869; Schumann *et al.*, 1911; Learmonth *et al.*, 1916; Ewing *et al.*, 1934; Mourali *et al.*, 1980; Chiedozi *et al.*, 1987), aunque hay estudios contradictorios (Meyer *et al.*, 1948; Swain *et al.*, 1989; Ibrahim *et al.*, 2000). Una historia familiar de cáncer mamario también parece estar asociada a la aparición de esta patología (Chang *et al.*, 1998-2; Aziz *et al.*, 2001).

A pesar de los tratamientos multimodales el pronóstico sigue siendo malo, con una tasa de supervivencia al tercer año del 40%, a diferencia del 85% de pacientes con otros tumores mamarios (Chang *et al.*, 1998; Cristofanilli *et al.*, 2003). La supervivencia media es de 2,9 años frente a 6,4 años en el caso de otros tumores mamarios localmente avanzados (Hance *et al.*, 2005).

En el caso de la especie canina la incidencia del CI es del 7,5% del total de displasias y neoplasias mamarias, y del 17% del total de perras con tumores malignos. Esta incidencia elevada podría tener relación con el hecho de que la mayor parte de la población de hembras adultas en España no están ovariectomizadas (Pérez-Alenza *et al.*, 2001). La prevalencia del CI canino al igual que la de la mujer ha aumentado en la últimas décadas, fenómeno puede deberse a la influencia directa del ambiente (Susaneck *et al.*, 1983; Pérez-Alenza *et al.*, 2001; Peña *et al.*, 2003). La media de edad de pacientes con CI es significativamente mayor (11,4 años) que la de los pacientes con tumores mamarios malignos distintos al carcinoma inflamatorio (9,9 años). No existe una mayor predisposición en una raza canina determinada de padecer esta enfermedad. La aparición del CI en perras coincide con la fase de diestro, momento del ciclo hormonal en el que los niveles de progesterona son máximos, pero no está asociada al hecho de haber recibido tratamientos previos con progestágenos para inhibir el celo (Pérez-Alenza *et al.*, 2001).

### 2.3 Clasificación

El carcinoma inflamatorio mamario está clasificado como T4d estadio IIIB de acuerdo con el *Manual for Staging of Cancer* publicado por American Joint Committee on Cancer en 1988



(también denominado sistema TNM), y está definido como entidad clinicopatológica distinta de otras lesiones T4, caracterizado por una induración difusa de la piel de la mama, normalmente sin una masa detectable (Beahrs *et al.*, 1988).

Existen otras clasificaciones como la que emplea el instituto Gustave-Roussy desde 1959, que clasifica el cáncer de mama como Poysee evolutive (PEV), teniendo en cuenta consideraciones de agresividad del tumor y signos de inflamación. Dentro de esta clasificación el CI estaría incluido dentro de la categoría PEV-2 o PEV-3. La clasificación de PEV-2 se corresponde con tumores que presentan inflamación y edema que afecta a una superficie menor que la mitad de la mama, mientras que los síntomas de la inflamación y el edema afectan a más de la mitad de la mama en la clasificación PEV-3 (Denoix *et al.*, 1970).

Dentro del Columbia Clinical Classification System propuesto por Haagensen el carcinoma inflamatorio mamario esta designado como estadio D (Haagensen *et al.*, 1971). Pero esta clasificación no se utiliza rutinariamente (Walshe *et al.*, 2005).

## 2.4 Características clínicas

### 2.4.1 Carcinoma inflamatorio mamario en la mujer

El síndrome se presenta clínicamente con un rápido crecimiento del tamaño de la mama con características de firmeza, dolor, engrosamiento, sensibilidad, calor y eritema de la piel que recubre la región mamaria (Jaiyesimi *et al.*, 1992) (Figura V.2.1). Las primeras manifestaciones son dolor, pesadez y quemazón de la mama, después la enfermedad progresa rápidamente y se observan los síntomas clínicos característicos (Walshe *et al.*, 2005). Los cambios en la piel de la mama suelen ser los primeros síntomas, variando en color y patrón de distribución dependiendo de la extensión de la enfermedad (Bland *et al.*, 1991). El rápido crecimiento de la mama es un síntoma patognomónico de la enfermedad que tiene lugar al mismo tiempo que los cambios en la piel de la región e implica un aumento de 2-3 veces su tamaño en pocas semanas (Walshe *et al.*, 2005).

Otros síntomas menos comunes son dolor axilar, picor en el pezón, edema de los brazos y dolor óseo. Los síntomas progresan rápidamente y muchos pacientes solicitan atención médica antes que aquellos con tumores mamarios distintos del carcinoma inflamatorio mamario.



**Figura V.2.1.** Carcinoma inflamatorio mamario en mujer: marcado aumento del tamaño de la mama y eritema.

La induración, edema cutáneo y eritema suelen abarcar un cuarto, la mitad o la mama completa, aunque en algunos casos se ve afectada en menos de un tercio con el mismo mal pronóstico (Piera *et al.*, 1986). También podemos observar regiones eritematosas cutáneas en otros tumores localmente avanzados, pero a diferencia del CI nunca afectan a más de un tercio de la mama (Walshe *et al.*, 2005). El color de la piel varía durante la progresión del CI, oscureciéndose hasta tonos púrpuras similares a la equimosis (Haagensen *et al.*, 1971). Pero estos cambios de coloración no son específicos de esta enfermedad y son más difíciles de apreciar en pieles oscuras (Hunter *et al.*, 1993; Walshe *et al.*, 2005).

No es frecuente la aparición de úlceras (Walshe *et al.*, 2005). Aunque las dos mamas pueden verse afectadas, algunos artículos han descrito una tendencia a la aparición de la enfermedad en la mama izquierda (Meyer *et al.*, 1948; Bozzetti *et al.*, 1981; Dershaw *et al.*, 1994), y aunque no es frecuente se ha descrito la aparición simultánea en las dos mamas (Agrawal *et al.*, 2003). En ausencia de tratamiento la enfermedad suele avanzar a la región mamaria no afectada inicialmente (Walshe *et al.*, 2005).

No se han encontrado anomalías laboratoriales asociadas al CI. Leucocitosis y fiebre normalmente no están presentes ya que no es un proceso de inflamación verdadero (Berger *et al.*, 1962; Walshe *et al.*, 2005).

#### **2.4.2 Carcinoma inflamatorio mamario en la perra**

Los síntomas clínicos en la perra incluyen lesiones mamarias de rápido crecimiento en forma de placas eritematosas, edematosas y calientes de aspecto parecido a una mastitis o dermatitis que ocasionan dolor de moderado a intenso (Figuras V.2.2 y V.2.3). Las mamas suelen verse afectadas de forma múltiple, es decir, los síntomas clínicos se observan en más de una glándula mamaria, y en un 54% de los casos la afectación es bilateral. También podemos encontrar edema de las extremidades, que puede ocasionar cojera, en un 60% de los pacientes, aumento del tamaño a la exploración de los nódulos linfáticos regionales (axilar y/o inguinal) en

un 96% y metástasis pulmonares observadas mediante estudio radiológico en un 31,8 % (Pérez-Alenza *et al.*, 2001).



**Figuras V.2.2 y V.2.3.** Carcinoma inflamatorio mamario en la especie canina: placas edematosas y eritema.

En el CI canino podemos encontrar también anorexia, decaimiento, pérdida de peso, dolor, polidipsia y poliuria, alteraciones sistémicas que no son frecuentes en tumores mamarios malignos caninos distintos al carcinoma inflamatorio (Pérez-Alenza *et al.*, 2001).

## 2.5 Formas clínicas de presentación del carcinoma inflamatorio

El carcinoma inflamatorio mamario en la mujer fue clasificado por Taylor y Meltzer como “primario” y “secundario”, definiendo carcinoma inflamatorio mamario primario como aquél en el cual los síntomas característicos se desarrollan a partir de una mama anteriormente sana, y carcinoma inflamatorio mamario secundario como aquél en el que aparecen los síntomas de inflamación en la mama posteriormente a una neoplasia mamaria previa no operada o después de una cirugía de un tumor mamario. Sin embargo el término “carcinoma inflamatorio mamario secundario” ha sido controvertido.

En el carcinoma inflamatorio mamario canino se han definido también estas formas clínicas de presentación atendiendo a la historia clínica de la patología mamaria: carcinoma inflamatorio primario y secundario. Clasificando el carcinoma inflamatorio mamario canino secundario a su vez como no post-quirúrgico y post-quirúrgico. No post-quirúrgico cuando se desarrolla a partir de un nódulo mamario previo no sometido a cirugía, que comienza desarrollar características clínicas de carcinoma inflamatorio mamario. Y post-quirúrgico cuando se desarrolla en forma de recidiva de un tumor mamario operado con clínica de carcinoma inflamatorio mamario (Pérez-Alenza *et al.*, 2001).

## 2.6 Etiopatogénia

Se desconocen muchos aspectos del carcinoma inflamatorio mamario, entre ellos su etiología. Esta patología mamaria posee características diferenciales con otros tumores mamarios desde el punto de vista genético, biológico y de comportamiento clínico (Jaiyesimi *et al.*, 1992). Además el CI parece presentar mecanismos endocrinos de regulación distintos a otros tipos de cáncer de mama, tanto en el caso de la mujer como el de la perra (van Golen *et al.*, 1999; Pérez-Alenza *et al.*, 2001; Illera *et al.*, 2003).

La dependencia hormonal del carcinoma inflamatorio (Illera *et al.*, 2003) y del cáncer mamario en general ha sido muy estudiada, encontrando relación entre las secreciones hormonales de tejido mamario tumoral y sano, y el desarrollo de tumores mamarios (Vermeulen *et al.*, 1986; Blankenstein *et al.*, 1999; Maggiolini *et al.*, 2001; Liao *et al.*, 2002). Estudios previos de CI canino relativos a secreción y regulación de diferentes hormonas tanto en suero como en el propio tejido mamario, indican que existe un mecanismo endocrino especial en el desarrollo del CI canino (Illera *et al.*, 2003; Peña *et al.*, 2003), como evidencias histopatológicas de la secreción de lípidos por las células del CI (Peña *et al.*, 2003) y de expresión inmunohistoquímica del receptor de estrógenos  $\beta$  (RE  $\beta$ ) y del receptor de andrógenos (RA) (Illera *et al.*, 2003; Illera *et al.*, 2006).

## 2.7 Patología

No existe un tipo histológico específico en el carcinoma inflamatorio mamario de la mujer (Taylor *et al.*, 1938; Perez-Mesa *et al.*, 1967; Haagensen *et al.*, 1971; Droulias *et al.*, 1976). Algunos de los tipos histológicos frecuentes son el carcinoma ductal infiltrativo, carcinoma lobular, carcinoma de células pequeñas, carcinoma medular y carcinoma de células largas indiferenciadas. Como hallazgos histopatológicos más comunes en el CI encontramos un carcinoma ductal de alto grado de malignidad, poco diferenciado y presencia de émbolos carcinomatosos en los vasos linfáticos de la dermis. Se observa una gran proporción de células tumorales pleomórficas en fase S y aneuploidía.

Fue Bryant en 1887 quien observó por primera vez la presencia de émbolos carcinomatosos en los vasos linfáticos de la dermis. Bryant hipotetizó que la obstrucción causada por los émbolos presentes en los vasos linfáticos a consecuencia de la invasión tumoral provocaba los síntomas característicos clínicos de eritema, calor, aumento y tumefacción difusa, dolor, firmeza y edema. Este descubrimiento llevó a pensar que los síntomas clínicos se correspondían siempre con la invasión linfática de la dermis, sin embargo esto ocurre en un 50%-

68% de los casos (Brooks *et al.*, 1998; Charpin *et al.*, 1992). Por otra parte, también es posible encontrar en el estudio histológico los émbolos tumorales en vasos linfáticos de la dermis sin que se produzca la manifestación clínica de la enfermedad, lo que se denomina carcinoma inflamatorio oculto (Saltzstein *et al.*, 1974). Se han encontrado émbolos en vasos linfáticos de la dermis en muestras recogidas de piel con síntomas característicos y de piel aparentemente no afectada del mismo paciente (Kleer *et al.*, 2000). Sin embargo no es común la infiltración de la piel por parte de las células tumorales fuera de los vasos linfáticos (Kleer *et al.*, 2000).

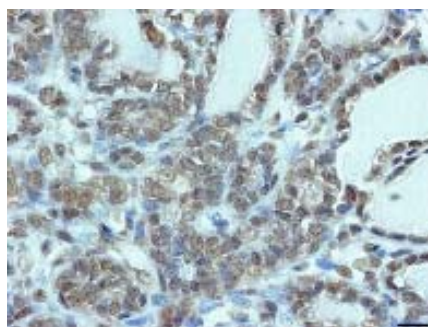
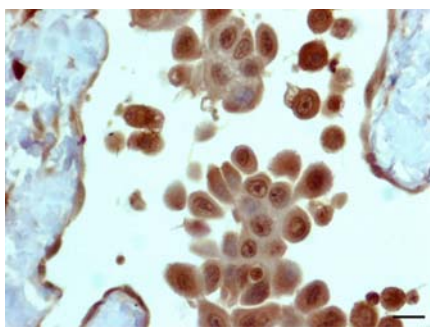
Estudios sobre la expresión inmunohistoquímica del receptor de estrógenos y el receptor de progesterona han ofrecido resultados variables, expresándose el receptor de estrógenos en un 22%-52% de los casos, y el receptor de progesterona del 16% al 34% (Ueno *et al.*, 1997; Fleming *et al.*, 1997; Brooks *et al.*, 1998; Wilke *et al.*, 1998).

A pesar de las discrepancias, la expresión proteica de erbB-2 y p53 estudiada mediante inmunohistoquímica es mayor en el CI que en otros tumores mamarios (Charpin *et al.*, 1992; Kleer *et al.*, 2001; Aziz *et al.*, 2001; McCarty *et al.*, 2002).

En el caso del CI canino también encontramos varios tipos histológicos: carcinomas simples (tubulares, sólidos y papilares), carcinomas ricos en lípidos, carcinomas de células escamosas y carcinomas complejos, todos ellos de elevada malignidad histológica (Pérez-Alenza *et al.*, 2001). El infiltrado inflamatorio es similar al que se encuentra en otros tumores mamarios caninos y se puede observar embolización tumoral masiva en los vasos linfáticos de la dermis. También se distinguen grupos multifocales de gotas lipídicas en el citoplasma celular en tumores no diagnosticados como carcinomas ricos en lípidos (en estos las gotas lipídicas se encuentran en más de un 80% de las células) (Peña *et al.*, 2003). El carcinoma rico en lípidos es un tipo de carcinoma mamario considerado poco frecuente en la especie humana (Tavassoli *et al.*, 1999) y canina (Misdorp *et al.*, 1999). La gran proporción de carcinomas ricos en lípidos dentro del CI podría deberse a la influencia hormonal (Tsubura *et al.*, 1991).

La invasión tumoral de la piel ofrece dos patrones histológicos distintos: 1) en forma de estructuras túbulo-papilares y 2) originando masas sólidas de aspecto “sarcomatoso”, muy anaplásicas. Estos patrones además se asocian a las distintas formas de presentación y a otras características clínicas e histopatológicas del carcinoma inflamatorio canino. Correspondiéndose el patrón de masa sólida “sarcomatosas” con el carcinoma inflamatorio canino primario, asociado a su vez con mayor dolor, ritmo de crecimiento más rápido, presencia de anisocitosis, anisocariosis, células multinucleadas, células gigantes, alta frecuencia de p53 mutado y ausencia de émbolos en los vasos linfáticos (Pérez-Alenza *et al.*, 2001).

Los carcinomas inflamatorios caninos son negativos a la detección inmunohistoquímica de receptores de estrógenos  $\alpha$  y positivos de un 55,5% a un 71,4% ante la detección de receptores de progesterona (Pérez-Alenza *et al.*, 2001; Peña *et al.*, 2003). Los tumores mamarios malignos caninos suelen tener una reducida expresión para el RE  $\alpha$  (Nieto *et al.*, 2000). La expresión del receptor de progesterona está asociada a la presentación secundaria de la enfermedad, mientras que la ausencia de RP está relacionada con la existencia de metástasis pulmonares (Peña *et al.*, 2003). Respecto a la detección inmunohistoquímica del receptor de estrógenos  $\beta$  el carcinoma inflamatorio canino es positivo en todos los tipos celulares, expresándose también en los émbolos tumorales de los vasos linfáticos (Illera *et al.*, 2006) (Figura V.2.4). Para el receptor de andrógenos la expresión inmunohistoquímica es heterogénea pero positiva en un 92,86% de los casos (Illera *et al.*, 2006) (Figura V.2.5).



**Figura V.2.4.** Carcinoma inflamatorio mamario canino. Células metastásicas en un vaso linfático positivas para el receptor de estrógenos  $\beta$ . Streptavidina-biotina-peroxidasa. **Figura V.2.5.** Carcinoma inflamatorio mamario canino. Carcinoma tubular poco reactivo para receptores de andrógenos. Tinción heterogénea. Streptavidina-biotina-peroxidasa. Bar= 44  $\mu$ m.

La expresión inmunohistoquímica de la proteína p53 es debida a mutaciones en el gen supresor de tumores p53, asociada con peor pronóstico en la especie humana (Faletto *et al.*, 1998) y canina (Wakui *et al.*, 2001). En la especie canina un 90,47% de CI se consideran positivos a la mutación del gen supresor p53 (Pérez-Alenza *et al.*, 2001). El índice de proliferación Ki-67 encontrado en el CI canino es elevado, y no esta asociado con otras variables clínicas o patológicas (Peña *et al.*, 2003), aunque en otros tumores mamarios caninos el índice Ki-67 está asociado a buen pronóstico (Peña *et al.*, 1998).

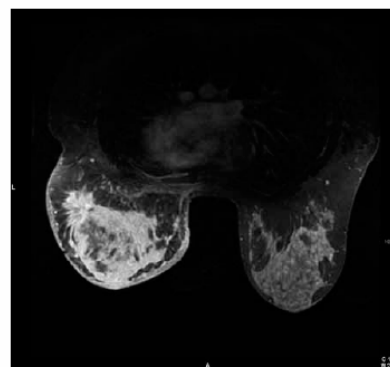
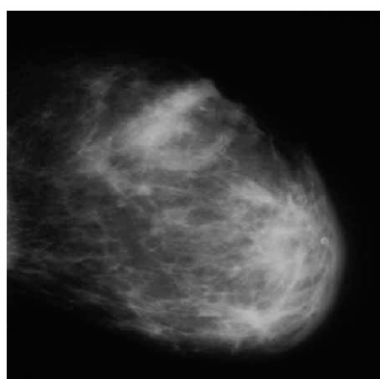
Dentro de los hallazgos de la necropsia del CI canino se puede observar: afectación de la piel, edema subcutáneo marcado, infiltración tumoral severa de tejidos adiposo y muscular, quistes ováricos con hiperplasia endometrial, y presencia de metástasis en nódulos linfáticos,

pulmón, útero, corazón, vejiga de la orina, glándulas adrenales e hipófisis (Pérez-Alenza *et al.*, 2001).

## 2.8 Diagnóstico

El diagnóstico del carcinoma inflamatorio mamario en la mujer puede realizarse clínica e histopatológicamente (Brooks *et al.*, 1998; Meloni *et al.*, 1999), sin diferencias en el pronóstico (Wilke *et al.*, 1998). El diagnóstico clínico de basa en la presentación de la sintomatología clínica característica del carcinoma inflamatorio mamario. El diagnóstico histopatológico se realiza mediante biopsia de la piel afectada que nos permite observar la invasión de los capilares linfáticos por parte del tumor, existiendo en el pasado controversia acerca de si esta característica patológica era esencial para el diagnóstico (Jaiyesimi *et al.*, 1992).

La citología con aguja fina puede ayudar en el diagnóstico del CI pero no se puede considerar como una prueba definitiva (Meloni *et al.*, 1999) ya que es necesaria mayor cantidad de tejido para que la muestra recoja una zona representativa. La mamografía también tiene un valor limitado ya que es difícil diferenciar entre carcinomas inflamatorios y no-inflamatorios mamarios porque tienen patrones radiológicos similares (Berger *et al.*, 1962) (Figura V.2.6). El CI se ha intentado diagnosticar con otras técnicas de diagnóstico por imagen como la ecografía, resonancia magnética y tomografía axial computerizada, sin embargo no existe ninguna imagen patognomónica de esta enfermedad (Chow *et al.*, 2005)(Figura V.2.7).



**Figura V.2.6.** Mamografía medio-lateral derecha de mujer con carcinoma inflamatorio mamario. Incremento difuso de la densidad y del dibujo trabecular cutáneo.

**Figura V.2.7.** Resonancia Magnética de mujer de 43 años con carcinoma inflamatorio mamario. Nódulo en mama derecha. Aumento difuso de la densidad cutánea.

Otras enfermedades poseen síntomas clínicos similares al CI lo que hace que a veces no se diagnostique bien clínicamente. Mastitis infecciosas y abscesos normalmente aparecen en mujeres en proceso de lactación y están asociadas a fiebre y leucocitosis lo que ocurre infrecuentemente en el CI. Ectasias ductales también pueden ser confundidas con CI, pero la inflamación esta más localizada y responde rápidamente al tratamiento de soporte en el caso de las ectasias ductales.

Linfosarcomas y leucemias que impliquen a la región mamaria son difíciles de distinguir clínicamente y pueden requerir diagnóstico histopatológico para su diferenciación. En los carcinomas distintos al carcinoma inflamatorio podemos encontrar presencia de eritema en la región mamaria pero no cursan con síntomas de inflamación aguda y el crecimiento tumoral es más lento. Sífilis y tuberculosis que afecten a la región mamaria pueden cursar con inflamación aguda, pero son enfermedades, según países, más difíciles de encontrar. Puede ser muy difícil distinguir entre CI y otros tipos de cáncer mamarios localmente avanzados (Jaiyesimi *et al.*, 1992). Es la rápida progresión del CI (normalmente en un intervalo de 10 semanas) asociado con la presencia de eritema en más de un tercio de la piel de la región mamaria lo que distingue a esta enfermedad de otros tumores localmente avanzados que desarrollan síntomas inflamatorios (Walshe *et al.*, 2005).

En el caso de la perra el diagnóstico clínico se establece mediante observación de las características clínicas de la región mamaria (Susaneck *et al.*, 1983). La existencia de alteraciones sistémicas, como pérdida de peso, postura de dolor y cojeras, puede ayudar en el diagnóstico, ya que éstas no son frecuentes en tumores mamarios malignos distintos del CI (Pérez-Alenza *et al.*, 2001). El diagnóstico histopatológico, basado principalmente en la presencia de émbolos tumorales en los vasos linfáticos de la dermis, es de importancia diagnóstica en la especie canina. Susaneck *et al.* encontraron un 90% de casos con embolización tumoral en los vasos linfáticos de la dermis. Sin embargo Pérez-Alenza *et al.* observaron una embolización en el 73% de los pacientes.

## 2.9 Factores pronósticos

Muchos de los parámetros pronósticos utilizados en otros tumores mamarios no son siempre relevantes en el caso del CI, como la afectación de nódulos linfáticos regionales (ya que casi todos los pacientes de CI tienen afectados los nódulos linfáticos axilares), o el tamaño tumoral que normalmente no es posible medir en CI (Lerebours *et al.*, 2005). Pero como existen pocos factores pronósticos propios del CI, se suelen tener en cuenta los factores pronósticos de tumores mamarios en general:



♦ **Afectación ganglionar.** Este factor pronóstico también lo es de otros tumores mamarios. Mujeres que presentan metástasis en nódulos linfáticos axilares tienen peor pronóstico en términos de recidiva y supervivencia. En un porcentaje del 46% al 100% de los casos de CI los nódulos linfáticos axilares y/o supraclaviculares se ven afectados (Lee *et al.*, 1924; Taylo *et al.*, 1938; Meyer *et al.*, 1948; Rogers *et al.*, 1956; Barber *et al.*, 1961; Haagensen *et al.*, 1971; Droulias *et al.*, 1976; Barrer *et al.*, 1980; Knight *et al.*, 1986). En el carcinoma inflamatorio mamario canino podemos encontrar un 96% de casos que presentan nódulos linfáticos regionales (axilares y/o inguinales) aumentados de tamaño y la totalidad de casos afectados si los diagnosticamos mediante necropsia (Pérez-Alenza *et al.*, 2001).

La evaluación de la diseminación de las células tumorales se suele realizar mediante el examen histopatológico de los ganglios centinela aunque en ensayos recientes se ha probado con éxito la detección de la metastatización mediante técnicas moleculares de PCR a tiempo real que examinan múltiples marcadores. Así la presencia de micrometástasis en el ganglio centinela está asociada con la aparición de metástasis en otros nódulos linfáticos (Weigelt *et al.*, 2004).

♦ **Metástasis a distancia.** Entre el 17% y el 36% de las mujeres con CI poseen metástasis a distancia cuando se realiza el diagnóstico, a diferencia del 5% de mujeres que padecen otros cánceres mamarios no inflamatorios. El número de pacientes con metástasis a distancia crece un 67% dentro del primer año después del diagnóstico (Schuman *et al.*, 1911; Donegan *et al.*, 1967; Nichini *et al.*, 1972; Barrer *et al.*, 1980). En el carcinoma inflamatorio canino encontramos un 31,8% de metástasis a distancia diagnosticadas mediante estudio radiológico, y un 61,9% diagnosticadas mediante necropsia. Además de metástasis en otros órganos: corazón (9,5%), útero (9,5%) y vejiga de la orina (4,8%) (Pérez-Alenza *et al.*, 2001).

♦ **Receptores hormonales.** La ausencia de receptores estrogénicos y de progesterona ha sido asociada con un menor intervalo libre de enfermedad y una menor supervivencia total en pacientes con cánceres mamarios. Los pacientes con CI poseen un número menor de receptores de estrógenos y progesterona que aquellos con otros tipos de cánceres de mama (De Larue *et al.*, 1981; Harvey *et al.*, 1982; Kokal *et al.*, 1985; Paradiso *et al.*, 1989; Maloisel *et al.*, 1990; Koh *et al.*, 1990). Pero para otros autores la ausencia del RE  $\alpha$  no se corresponde con un peor pronóstico (Paradiso *et al.*, 1999; Lerebours *et al.*, 2003). En el caso del carcinoma inflamatorio mamario canino todos los casos son negativos para la detección inmunohistoquímica del receptor de estrógenos  $\alpha$  y positivos en un 55,55% para la detección del receptor de progesterona (Pérez-Alenza *et al.*, 2001).

♦ **Edad.** En las mujeres es un factor pronóstico favorable a diferencia de la especie canina (Hellmen *et al.*, 1993). La edad media de las perras con CI es mayor (11,4 años) que la de las perras con otros tumores mamarios malignos (9,9 años).

♦ **Presencia o ausencia de émbolos tumorales en los vasos linfáticos de la dermis.** Es un factor pronóstico controvertido, ya que según estudios realizados en mujeres por Levine *et al.*, los pacientes que se diagnostican por su sintomatología clínica pero carecen de la invasión tumoral de los vasos linfáticos, poseen una tasa de supervivencia del 60% al 3 año, de un 52% en aquellos que son diagnosticados histopatológicamente pero carecen de síntomas clínicos, y de un 34% en pacientes con síntomas clínicos y evidencias histopatológicas. Sin embargo Lucas y Perez-Mesa encontraron que la supervivencia total era similar en pacientes con síntomas clínicos e histopatológicos, que en aquellos con solo síntomas clínicos.

♦ **Extensión de la inflamación mamaria,** que se corresponde con la clasificación PEV-3, es un factor pronóstico propio del CI, y esta asociado a un mal pronóstico (Chevallier *et al.*, 1987; Rouesse *et al.*, 1990; Lerebours *et al.*, 2003; Palangie *et al.*, 1994).

♦ **Respuesta al tratamiento con quimioterapia.** Es el mejor factor pronóstico del CI. La respuesta a la quimioterapia se suele valorar clínicamente, pero también histopatológicamente. Una respuesta clínica a la quimioterapia esta asociada con mayor supervivencia (Chevallier *et al.*, 1987; Palangie *et al.*, 1994; Buzdar *et al.*, 1995; Ueno *et al.*, 1997), al igual que la respuesta histopatológica (Feldman *et al.*, 1986; Chevallier *et al.*, 1993; Harris *et al.*, 2003).

♦ **p53.** Existe una correlación positiva entre la sobre-expresión nuclear de p53 y un peor pronóstico (Riou *et al.*, 1993). Se asocian las mutaciones en p53 con una menor respuesta a la quimioterapia (Feki *et al.*, 2004). En el caso del carcinoma inflamatorio mamario canino Pérez-Alenza *et al.* encontraron una alta frecuencia de p53 mutado en los casos de peor pronóstico. No se ha establecido asociación entre la expresión inmunohistoquímica de la proteína p53 y mutaciones de dicho gen, de hecho algunos estudios apuntan que la correlación pronóstica sólo se observa con la presencia de mutaciones de p53 y no con los estudios inmunohistoquímicos (Lowe *et al.*, 1993; Sjogren *et al.*, 1996; Levine *et al.*, 1997).

♦ **Genes pronósticos.** Existen 3 genes cuyo perfil de expresión está relacionado con buen pronóstico, pronóstico medio o mal pronóstico en pacientes con CI. Se trata de los genes

MYCN, EREG y SHH (Bieche *et al.*, 2004). También han encontrado otros genes relacionados: erbB-2, MIB1, MUC1 y E-cadherina, pero su valor pronóstico es controvertido (Guerin *et al.*, 1989; Prosa *et al.*, 1994; Charafe-Jauffret *et al.*, 2004).

## 2.10 Carcinoma inflamatorio mamario oculto

El término carcinoma inflamatorio oculto (CIO) hace referencia a aquellos pacientes que presentan émbolos tumorales en los vasos linfáticos cutáneos o del parénquima asociados con un tumor primario pero sin eritema cutáneo u otros síntomas característicos del CI (Kleer *et al.*, 2000). El pronóstico de estos pacientes es peor, con un porcentaje de 5 años libres de enfermedad del 25,6% frente al 51,6% ( $p < 0.0001$ ) de pacientes con síntomas clínicos, y una supervivencia total del 28,6% frente al 40% ( $p < 0.05$ ) (Ruiz Simón *et al.*, 2000). Otras características comparadas según un estudio realizado por Ruiz *et al.*:

	CI	Porcentaje	CIO	Porcentaje
Edad	52,3		63,8	
Meses desde el 1º síntoma al diagnóstico	3,4		6,8	
Estado				
Premenopáusico	48	29,4	18	20
Perimenopáusico	25	15,3	0	
Postmenopáusico	90	55,2	81	80
Histopatología				
Carcinoma ductal	138	84,6	85	85,8
Carcinoma lobular	11	6,7	9	9
Otros	14	8,5	5	5
Linfonódulos axilares				
N0	26	15,9	18	18,1
N1	89	54,6	66	66,7
N2	29	17,7	12	12,1
Linfonódulos supraclaviculares	19	11,6	3	3,1
Émbolos en vasos linfáticos				
Conocidos	129	79,2	99	100
Positivos	92	71,3	99	100
Negativos	37	28,6	-	
Desconocidos	34	20,8		

Receptor de estrógenos	CI	Porcentaje	CIO	Porcentaje
Conocidos	113	69,3	91	91,9
Positivos	31	27,4	47	51,6
Negativos	82	72,6	44	48,4
Desconocidos	50	30,7	8	8,1

## 2.11 Tratamiento

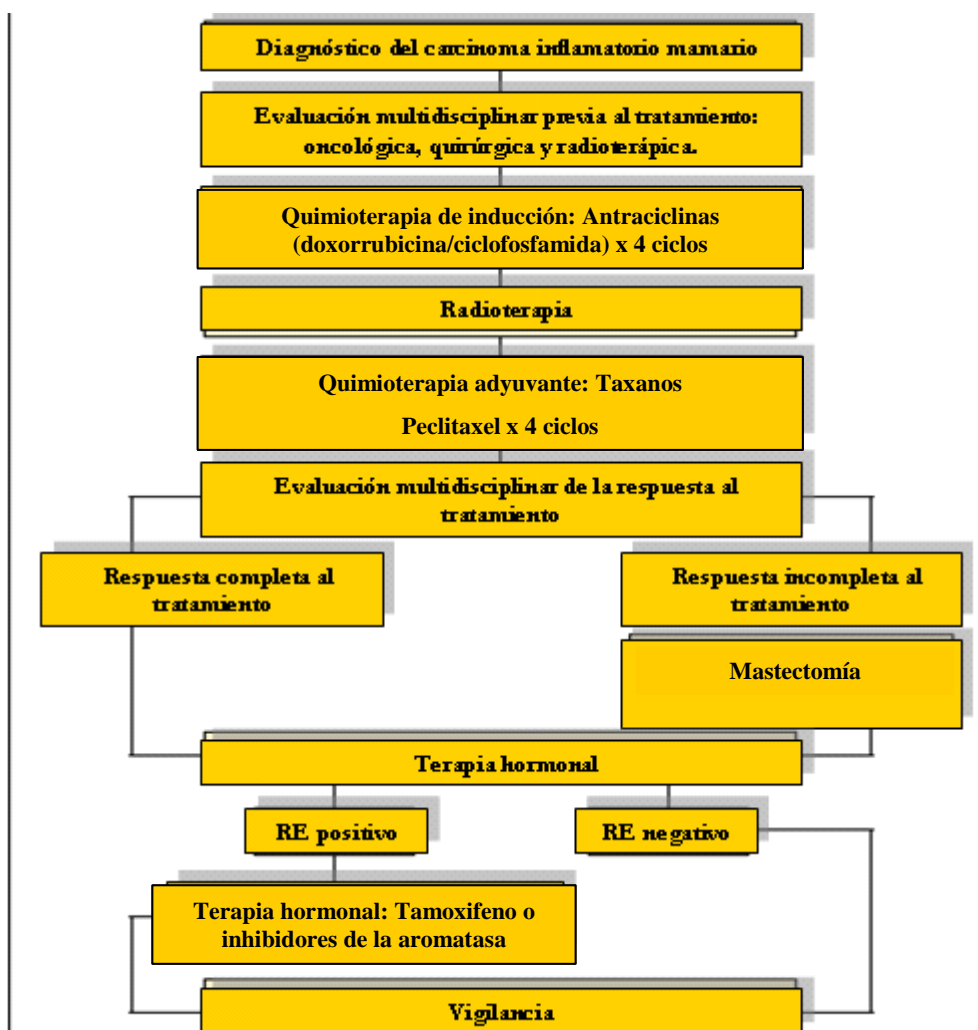
El tratamiento utilizado actualmente en la mujer consiste en un tratamiento multimodal que comienza con la administración de quimioterapia, con antraciclinas como fármaco base o combinadas con taxanos, seguida de mastectomía y disección de los nódulos linfáticos axilares en el caso de pacientes con respuesta a la quimioterapia, radioterapia regional y terapia hormonal en algunos casos (Fleming *et al.*, 1997; Critofanilli *et al.*, 2003).

El tratamiento quirúrgico consistente en la resección de la zona afectada fue la primera modalidad terapéutica utilizada, pero sin demasiado éxito ya que la tasa de supervivencia en varios estudios en los que se realizaron mastectomías radicales o simples como tratamiento era de un 10% o menor (Jaiyesimi *et al.*, 1992). La radioterapia sola o utilizada conjuntamente a la cirugía mostró una mejora del control tumoral loco-regional, pero no mejoraba la supervivencia (Barker *et al.*, 1980). Terapias hormonales como la administración de tamoxifeno no producían respuesta observable (Veronesi *et al.*, 1981).

Actualmente se utilizan tratamientos que combinan distintas modalidades o tratamientos multimodales. Estos comprenden dos o cuatro ciclos de quimioterapia sistémica seguidos de la evaluación de su eficacia; terapia local mediante cirugía, radioterapia o ambas combinadas; y por último quimioterapia adyuvante.

Dentro de la terapia multimodal se han utilizado distintos protocolos respecto a la duración y fármacos utilizados en la quimioterapia, y tipos e intensidad de las terapias locales (Jaiyesimi *et al.*, 1992). La supervivencia total tras el tratamiento multimodal puede llegar a alcanzar 44,8 meses (Brooks *et al.*, 1998). Los avances en la terapia sistémica han reducido el riesgo de metástasis y han hecho que la optimización del control loco-regional de la enfermedad sea crítico (Bristol *et al.*, 2005). Utilizando quimioterapia adyuvante, mastectomía y radioterapia hiperfraccionada como tratamientos loco-regionales se ha logrado un control regional de aproximadamente el 85% de los casos (Liao *et al.*, 2000). Aunque algunos estudios han cuestionado la efectividad de la mastectomía (Arthur *et al.*, 1999; De Boer *et al.*, 2000), la mayoría sostiene que su uso rutinario mejora el control local y la supervivencia (Fields *et al.*, 1989; Perez *et*

*al.*, 1994; Fleming *et al.*, 1997; Panades *et al.*, 2005). Los pacientes positivos a receptores hormonales pueden recibir tratamiento hormonal adyuvante para reducir el riesgo de recidivas (Giordano *et al.*, 2003). Con el tratamiento multimodal cerca de un tercio de los pacientes no recidivan hasta 10 años después del tratamiento, siendo interesante identificar el resto de pacientes (2/3) que requieren tratamientos intensificados, prolongados o nuevos (Lerebours *et al.*, 2005).



**Figura V.2.8.** Secuencia de tratamiento del carcinoma inflamatorio mamario

Otro tratamiento, cuyos beneficios no están todavía probados (Arun *et al.*, 1999; Bertucci *et al.*, 2004), es la administración de quimioterapia a altas dosis con transplante autólogo de médula ósea en pacientes con CI y otros cánceres mamarios de alto riesgo. La tasa de respuesta total y remisión completa en el caso de carcinoma mamarios metastáticos para esta tratamiento, oscila entre el 54 y el 68% (Peters *et al.*, 1988; Jones *et al.*, 1990; Dunphy *et al.*, 1990). En la terapia

se utiliza el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos para mejorar la hematopoyesis y reducir las toxicidades relacionadas (Jaiyesimi *et al.*, 1992).

El tratamiento en caso de la especie canina es por el momento solo paliativo con la administración de antibióticos y antiinflamatorios, debido a las limitaciones económicas y de instalaciones, y a la falta de remisión total de la enfermedad.

### **2.11.2 Futuros tratamientos**

Respecto al tratamiento en la mujer se sigue estudiando cuál es el mejor protocolo quimioterápico según la combinación de fármacos, ciclos durante las sesiones inductoras y adyuvantes y el mejor método para valorar la respuesta de la quimioterapia inductora. Son necesarias mejoras en la respuesta del tratamiento sistémico (Giordano *et al.*, 2003). Tampoco hay estudios definitivos sobre la estrategia óptima de combinación de las terapias regionales (Yang *et al.*, 2005). Se estudia además el papel de los tratamientos hormonales solos o administrados conjuntamente con quimioterapia (Jaiyesimi *et al.*, 1992). También tratamientos con inhibidores de la farnesil transferasa que revierten el fenotipo invasivo debido a la sobre-expresión de RhoC GTPasa (van Golen *et al.*, 2002) y tratamientos frente a mediadores de la angiogénesis como VEGF, factor de crecimiento fibroblástico y Flt-1 (Giordano *et al.*, 2003). Dentro de los inhibidores de la angiogénesis el fármaco bevacizumab (inhibidor de VEGF) ha sido de los más estudiados, mostrando una buena respuesta cuando se le combina con otros agentes citotóxicos (Miller *et al.*, 2005; Cobleigh *et al.*, 2003; Margolin *et al.*, 2001). También se ha combinado este fármaco con quimioterapia adyuvante consiguiendo un descenso de la permeabilidad vascular y un aumento de la apoptosis (Wedam *et al.*, 2004; Overmoyer *et al.*, 2001).

Otra diana de los nuevos tratamientos es erbB-2, miembro de la familia tirosina quinasas, y codificado por el gen c-erbB-2 (Reese *et al.*, 1997), cuya sobre-expresión se ha asociado con características de agresividad histológicas (Seshadri *et al.*, 1993). Trastuzumab es un anticuerpo monoclonal humanizado anti-erbB-2 (Carter *et al.*, 1992), que combinado con quimioterapia ha mostrado un incremento en la tasa de respuesta al tratamiento en carcinomas inflamatorios mamarios metastáticos positivos a erbB-2 (Salmón *et al.*, 2001; Marty *et al.*, 2005). También el fármaco Lapatinib, un potente inhibidor reversible de erbB1 y erbB-2, frena el crecimiento e induce la apoptosis celular de líneas celulares y modelos *in vivo* erbB1 o erbB-2 dependientes (Xia *et al.*, 2002).

## 2.12 Modelos *in vivo* e *in vitro*

### 2.12.1 Líneas celulares

SUM-149 y SUM-190 son dos líneas celulares establecidas a partir de carcinomas inflamatorios mamarios primarios, a partir de las cuales se provocan carcinomas inflamatorios mamarios en ratones inmunodeficientes (Forozan *et al.*, 1999). Estas líneas celulares han sido caracterizadas mediante hibridación genómica comparativa encontrando frecuentes deleciones en 3p, 8p, 11p, 11q y 13q, que aumentan en 1q, 7q, 8q y 17q, sugiriendo la presencia de genes candidatos en esas regiones (Forozan *et al.*, 1999).

### 2.12.2 Modelos *in vivo*

Se han desarrollado dos modelos animales denominados MARY-X (Alpaugh *et al.*, 1999) y WIBC-9 (Shirakawa *et al.*, 2001) (Figura V.2.9). Los ratones inmunodeficientes xenotransplantados MARY-X desarrollaron tumores dentro de vasos sanguíneos y linfáticos, y eritema cutáneo. Al igual que las muestras de carcinoma inflamatorio humano los ratones son RE negativos, RP negativos, p53 positivos y receptor de crecimiento epidérmico positivos, pero erbB-2 negativos (Alpaugh *et al.*, 1999). Comparando MARY-X con los ratones xenotransplantados no-CI MDA-MB-231 y MDA-MB-468 Alpaugh *et al.* demostraron que solo la carencia de RE y RP, y la presencia de p53 no conducen al desarrollo del CI. Otra diferencia del modelo MARY-X con los modelos MDA-MB-231 y MDA-MB-468 es la sobre-expresión de E-cadherina y MUC1 (Alpaugh *et al.*, 1999; Alpaugh *et al.*, 2002).



**Figura V.2.9.** Modelo WIBC-9.

La línea WIBC-9 se originó a partir de pacientes con CI, preservando las características biológicas e histológicas del carcinoma inflamatorio mamario humano. Por ello encontramos

eritema cutáneo, alta tasa de metástasis a distancia e invasión de los vasos linfáticos de la dermis. Sin embargo los ratones WIBC-9 presentan dos características histológicas únicas: ausencia de células endoteliales y estructuras tubulares en nidos tumorales centrales. Además encontramos aneuploidía, amplificación de *erbB-2*, pérdida de receptores hormonales y sobre-expresión de los genes *L-8*, *VEGF*, *bFGF*, *angiopoyetina 1*, *Flt-1*, *TIE2* y *TIE1* cuando comparamos con modelos distintos del CI (Shirakawa *et al.*, 2001).

Las especies canina y felina desarrollan el CI de forma espontánea. Siendo descrita esta patología por primera vez en el caso de la especie canina por Susaneck *et al.* en 1983 y la especie felina por Pérez-Alenza *et al.* en 2004. La especie canina desarrolla la enfermedad con características clínicas y patológicas similares a la especie humana (Susaneck *et al.*, 1983). Sin embargo en la especie felina el CI tiene una menor incidencia, solo se desarrolla como carcinoma inflamatorio secundario postquirúrgico frecuentemente asociado a una reacción inflamatoria de rechazo a la sutura, y es positivo inmunohistoquímicamente a receptores hormonales (Pérez-Alenza *et al.*, 2004).

## **2.13 Características moleculares: genes implicados**

Dentro de los estudios moleculares realizados en el CI podemos diferenciar entre aquellos que se han centrado en uno o varios marcadores, o los más recientes realizados mediante microarrays que pretenden identificar el patrón específico de expresión del CI. Este patrón de expresión podría permitir el diagnóstico molecular de la enfermedad y/o calcular la probabilidad de que el CI se desarrolle (Perou *et al.*, 2000; Bieche *et al.*, 2004; Charafe-Jauffret *et al.*, 2004, Bertucci *et al.*, 2004; Van Laere *et al.*, 2005; Bertucci *et al.*, 2005; Van Laere *et al.*, 2006).

### **2.13.1 Genes asociados a tumores mamarios**

Las alteraciones de *erbB-2* y *p53* suelen estar asociadas a tumores mamarios de mayor agresividad. El gen *erbB-2*, también denominado, *HER-2/neu* es miembro de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico. En un estudio sobre 80 muestras de CI Guerin *et al.* encontraron una expresión de *erbB-2* del 41% mediante la técnica Southern Blotting. Mediante la misma técnica Prost *et al.* encontraron un 39% de 96 muestras con CI que expresaban *erbB-2*, frente al 18% de 224 muestras de otros tumores mamarios. La expresión del ARNm del gen *erbB-2* estudiada mediante Northern Blotting también es mayor en el CI comparada con otros tumores mamarios (sobre-expresión en un 61% de los casos a diferencia del 39% en tumores mamarios no CI) (Guerin *et al.*, 1989). Se han corroborado estos datos mediante la técnica de



PCR a tiempo real observando que la sobre-expresión del gen *erbB-2* es más frecuente en el CI (36%), que en otros tumores mamarios (26%) (Turpin *et al.*, 2002).

p53 está mutado en aproximadamente el 30% de los tumores mamarios, pudiéndose detectar esta mutación a nivel nucleotídico o proteico utilizando técnicas inmunohistoquímicas (Aas *et al.*, 1996). El gen p53 suele encontrarse mutado en cánceres mamarios de estado avanzado y/o muy agresivos ya que su función es mantener la integridad del genoma previniendo el acumulo de mutaciones. En el CI encontramos mutaciones del exón 5 al 8 en un 30-60% (Moll *et al.*, 1992; Riou *et al.*, 1993; Faille *et al.*, 1994; Turpin *et al.*, 2002). En estudios funcionales Turpin *et al.* encontraron una expresión del gen p53 mutado del 57% de 63 muestras de CI frente a una expresión del 37% de 27 muestras de otros tumores mamarios localmente avanzados. En un estudio de 27 casos Moll *et al.* describieron dos mecanismos, mutaciones sin sentido y exclusión nuclear, que alteran la función de p53 inactivándolo en el CI.

También se ha encontrado sobre-expresión de E-cadherina y MUC1 (Alpaugh *et al.*, 1999; Tomlinson *et al.*, 2001; Alpaugh *et al.*, 2002). La carencia de la proteína E-cadherina (E-cadherina negativa) se ha asociado con falta de diferenciación celular, alto grado de malignidad histológica, metastatización y baja tasa de supervivencia (Gamillo *et al.*, 1993; Oka *et al.*, 1993). Kleer *et al.* describieron que el CI es predominantemente E-cadherina positivo (100% de lo CI frente al 68% de los no-CI), con marcada expresión en los émbolos tumorales de los vasos linfáticos. MUC1 es el ligando de la E-selectina (receptor de adhesión celular) en la membrana de las células endoteliales (Alpaugh *et al.*, 2002). El mecanismo molecular de expresión de E-cadherina y MUC1 disfuncional en el CI puede contribuir significativamente a su progresión metastática (Alpaugh *et al.*, 2002). Además Charafe-Jauffret *et al.* describieron la sobre-expresión de E-cadherina y MUC1 como parte de la “firma inflamatoria” del CI.

### 2.13.2 Genes inflamatorios

El rápido comienzo de los síntomas inflamatorios y la elevada tasa de metástasis a distancia sugieren que citoquinas, factores de crecimiento y factores angiogénicos pueden estar involucrados en el CI, sin embargo se encuentran cantidades insignificantes de citoquinas, interferon gamma, IL-1 y IL-12 (Bieche *et al.*, 2004). La cuantificación de los niveles de expresión de distintas citoquinas (IFN  $\gamma$ , TNF, IL-1A, IL-1B, IL-8 y IL-10) llevada a cabo por Bieche *et al.* mediante PCR a tiempo real comparando muestras de CI con otros tejidos mamarios no obtuvo señales de sobre-expresión de estos genes, confirmando que el fenotipo inflamatorio de esta patología es debido al bloqueo de los vasos linfáticos por la presencia de émbolos tumorales, y no por la infiltración de células inflamatorias.

### **2.13.3 Genes relacionados con angiogénesis**

Se ha observado un incremento significativo de la densidad de la microvasculación intratumoral en el CI (McCarthy *et al.*, 2002). Estudios realizados por Colpaert *et al.* obtuvieron evidencias histológicas de intensidad angiogénica, observada mediante porcentaje de células endoteliales, en el CI. La intensa angiogénesis podría deberse a la hipoxia, de ahí la correlación observada entre el marcador de hipoxia anhidrasa carbónica IX y la proliferación de células endoteliales (Colpaert *et al.*, 2003).

En el CI encontramos una mayor expresión medida mediante PCR a tiempo real de los genes ANGPT1, TIE1, TIE2 y bFGF frente a otros tumores mamarios (Van der Auwera *et al.*, 2003). El estudio llevado a cabo por Van der Auwera *et al.* encontró una mayor expresión de los genes KDR, ANGPT1, TIE1, TIE2, FGF-2, VEGF-C, VEGF-D, prox-1 y LYVE-1 en el CI con respecto a tumores mamarios no CI (Van der Auwera *et al.*, 2004). También fue observada una gran expresión de los genes VEGF, bFGF, IL-6 y IL-8 por el grupo de Kleer *et al.* en el año 2000.

Los factores de crecimiento linfangiogénicos VEGF-C y VEGF-D promueven las metástasis linfáticas induciendo la formación de nuevos vasos linfáticos relacionados con el tumor y se encuentran sobre-expresados en el CI (Kurebayashi *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2004; Van der Auwera *et al.*, 2004; Tammela *et al.*, 2005).

Bieche *et al.* identificaron algunos genes relacionados con la angiogénesis que se encontraban sobre-regulados en el CI: VEGF, TBXA2R, PTGS2/COX-2, THBD/trombomodulina y ANGPT2/angiopoyetina 2; y otros cuya expresión era similar en el CI y en otros tumores mamarios: VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGFR1, VEGFR2 y VEGFR3.

### **2.13.4 Genes implicados en el carcinoma inflamatorio mamario**

En el CI se ha encontrado en series de 66 muestras un 52% de pérdida de heterocigosis, utilizando 71 microsatélites localizados en 21 regiones cromosómicas de 12 brazos cromosómicos, asociada con cánceres mamarios primarios, poniendo de relieve la gran inestabilidad en células del CI (Lerebours *et al.*, 2002). Además las regiones 3p21-p14, 6p, 8p22, 11q, 13q14, y 17q21 suelen estar alteradas con mayor frecuencia en el CI que en otros tumores mamarios. Estos hallazgos facilitan la búsqueda de genes candidatos en estas regiones (Lerebours *et al.*, 2005).

También se han identificado genes candidatos mediante técnicas de análisis de la expresión de genes. Por ejemplo, van Golen *et al.* encontraron 17 genes expresados diferencialmente en la línea celular SUM-149 respecto a células epiteliales mamarias normales. Sin

embargo en el mismo estudio utilizando la técnica de hibridación *in situ* solo dos genes RhoC GTPase y otro gen que denominaron “Lost in Inflammatory Breast Cancer gene” LIBC (actualmente llamado WISP3), estaban sobre-expresado y menos expresado respectivamente en el CI comparado con otros tumores mamarios de malignidad III (van Golen *et al.*, 1999).

El gen LIBC/WISP3 está localizado en la región Hsa 6q22-q23 (región con frecuentes deleciones en tumores mamarios), pertenece a la familia IGFBP que está implicada en la progresión cancerígena regulando el crecimiento celular, la invasión y angiogénesis (van Golen *et al.*, 1999). Este gen parece que funciona como gen supresor de tumores en el tejido mamario y su pérdida de función contribuye al fenotipo proliferativo e invasivo (Kleer *et al.*, 2002).

RhoC GTPase es un oncogen transformante en células mamarias humanas de importancia en la alta invasividad característica del CI (van Golen *et al.*, 2000). Este oncogen controla todos los aspectos de movilidad celular e invasión, incluida polaridad, organización del citoesqueleto y transducción de señales desde el medio extracelular, de factores del crecimiento particularmente (van Golen *et al.*, 2000; Ridley *et al.*, 2001; Kjoller *et al.*, 1999). La expresión de RhoC GTPase parece estar modulada por WISP3, y los dos genes podrían actuar conjuntamente en esta enfermedad (Kleer *et al.*, 2004). Sin embargo en otros estudios realizados por Turpin *et al.* solo se encontró sobre-expresión del gen RhoC GTPase en 3 de 32 carcinomas inflamatorios mamarios.

Comparando muestras de CI con otras correspondientes a otros tumores mamarios localmente avanzados mediante PCR a tiempo real encontraron 27 genes sobre-expresados en CI, de los cuales; 7 se corresponden con factores de transcripción (jun, EGR1, junB, fos, fosB, MYCN y SNAI1), 4 de los cuales son componentes de la familia del factor de transcripción AP-1 (jun, junB, fos y fosB) que está implicada en variedad de procesos tumorales, y los otros 20 son genes que codifican para factores de crecimiento (VEGF, DTR/HB-EGF, IGFBP7, IL-6, ANGPT2, EREG, CCL3/MIP1A y CCL5/RANTES) o sus receptores (TBXA2R, TNFRSF10A/TRAILR1 y ROBO2), relacionados con angiogénesis (Bieche *et al.*, 2004). En este mismo estudio no encontraron expresión diferente entre las muestras para los genes RhoC GTPase y WISP3, lo que contradice otros estudios.

Se ha descrito también la sobre-expresión en el CI respecto a otros tumores mamarios de genes diana NF- $\kappa$ B, postulando que podrían ser responsables de los síntomas inflamatorios y la gran agresividad metastásica (Van Laere *et al.*, 2005).

### **2.13.5 Subtipos moleculares**

Aunque se han identificado los cinco subtipos moleculares descritos en tumores mamarios en general utilizando microarrays, una mayor proporción se corresponden con patrones de

expresión del tipo basal, a diferencia de otros tumores mamarios cuyo subtipo predominante es el luminal/RE+ (Perou *et al.*, 2000; Bertucci *et al.*, 2004; Van Laere *et al.*, 2005; Bertucci *et al.*, 2005; Van Laere *et al.*, 2006). El patrón de expresión tipo basal se corresponde con un peor pronóstico (Low *et al.*, 2004).

También se ha intentado clasificar respecto a sus características moleculares al CI. Estos estudios lograron encontrar la asociación de 5 genes con distintos pronósticos de mujeres que padecían CI. De este forma asociaron los genes MYCN, SHH y EREG con malo, intermedio y buen pronóstico respectivamente, y asociaron la inhibición de los genes VEGF-A y IL8 a recidivas después del tratamiento (Lerebours *et al.*, 2003; Lerebours *et al.*, 2008).

### 3 METODOLOGÍA TÉCNICA

El CI es un síndrome de etiología desconocida y características clínicas, histopatológicas y moleculares distintas a otros tumores mamarios. Por tanto es necesaria la identificación de los cambios del patrón de expresión específico que le confieren su fenotipo específico y su agresividad, y de las rutas metabólicas implicadas en su desarrollo.

Es muy probable que la identificación de cambios moleculares significativos en CI mejoren el diagnóstico, predicción de la respuesta al tratamiento y el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas.

#### 3.1 Biología molecular y cáncer

El cáncer es la proliferación de clones que surge debido a distintas mutaciones que confieren ventajas selectivas de crecimiento a las células. Los genes mutados que están implicados en el desarrollo del cáncer se denominan “genes del cáncer”. Por el momento han sido identificados más de 350 (Futreal *et al.*, 2004). Estos genes se han identificado mediante diferentes estrategias de mapeo físico y genético, y mediante análisis de genes candidatos funcionales. La secuenciación completa del genoma humano ha permitido la resecuenciación sistemática del “genoma cancerígeno” mostrando el compendio de mutaciones en cánceres individuales, y la identificación de muchos genes implicados (Futreal *et al.*, 2001).

Las mutaciones somáticas tienen lugar en el genoma de células en división tanto normales como neoplásicas, durante la replicación del ADN o por la exposición a mutágenos exógenos o endógenos. El genoma de células cancerígenas puede portar dos clases biológicas de mutaciones somáticas: “conductoras”, que confieren ventajas proliferativas en las células con estas mutaciones y están directamente implicadas en el desarrollo del cáncer, y “pasajeras” que son biológicamente neutras, es decir, que no confieren ventajas proliferativas. Las mutaciones somáticas pasajeras se encontraban presentes en la célula progenitora del clon causante del desarrollo neoplásico (Greenman *et al.*, 2007).

Dentro de la complejidad de las alteraciones moleculares involucradas en el desarrollo neoplásico es importante destacar la distinción de los genes gatekeepers (controladores del ciclo celular) y los caretakers (controladores de la replicación del ADN), y el hecho de que las células pueden tener sólo uno o algunos de estos genes inactivados y que varían según el tipo celular (Kinzler *et al.*, 1997). Esta concepción de los genes reguladores específicos de determinados tipos celulares explicaría por qué mutaciones que se heredan por línea germinal solo tienen efectos oncogénicos en determinadas localizaciones del organismo (Ramón y Cajal, 2000).

Salvo algunos procesos hematopoyéticos, linfoproliferativos y tumores infantiles de células pequeñas no hay alteraciones moleculares específicas de un determinado tumor, es decir que existen pocos tumores con alteraciones constantes y/o patognomónicas. Dentro del gran número de alteraciones moleculares que pueden conllevar ventaja de crecimiento celular, los múltiples agentes carcinógenos (químicos, víricos y radiaciones) pueden elegir o activar indistintamente a varios de ellos y lo que finalmente lleva al desarrollo tumoral es la acumulación complementaria de varias alteraciones oncogénicas que contrarresten los controles fisiológicos de proliferación celular y los diversos factores mesenquimales e inmunológicos (Ramón y Cajal, 2000). Por lo tanto es importante el estudio de aquellas rutas metabólicas implicadas en el desarrollo de un tipo de presentación clínica de características especiales, como es el CI, mediante la utilización de *pools* de ARN que minimicen los resultados en cuanto a diferencias de expresión debidos a alteraciones moleculares pasajeras o específicas de un tipo celular.

Los procesos tumorales van acumulando durante su desarrollo numerosas alteraciones moleculares, hecho que se tiende a explicar por la propia dinámica del proceso carcinogénico y por la presencia de diversas alteraciones moleculares que favorecen la acumulación de múltiples errores genéticos en las células (Ramón y Cajal, 2000).

### 3.2 Técnicas para el análisis de la expresión génica

En el análisis de la expresión de genes se estudia el perfil transcripcional o perfil de expresión, que se define como el conjunto de ARN mensajero que se transcribe a partir del ADN según un patrón dependiente del tejido, edad y contexto en general. Así la expresión del ARN mensajero está modulada por gran cantidad y variedad de estímulos.

Las técnicas que permiten evidenciar los perfiles de expresión son la base del desarrollo de la genética funcional. Existen varias técnicas para el estudio del perfil transcripcional según el conocimiento previo del genoma y el número de genes a estudio, y la dificultad de la técnica y su coste. Las podemos agrupar en dos grandes grupos:

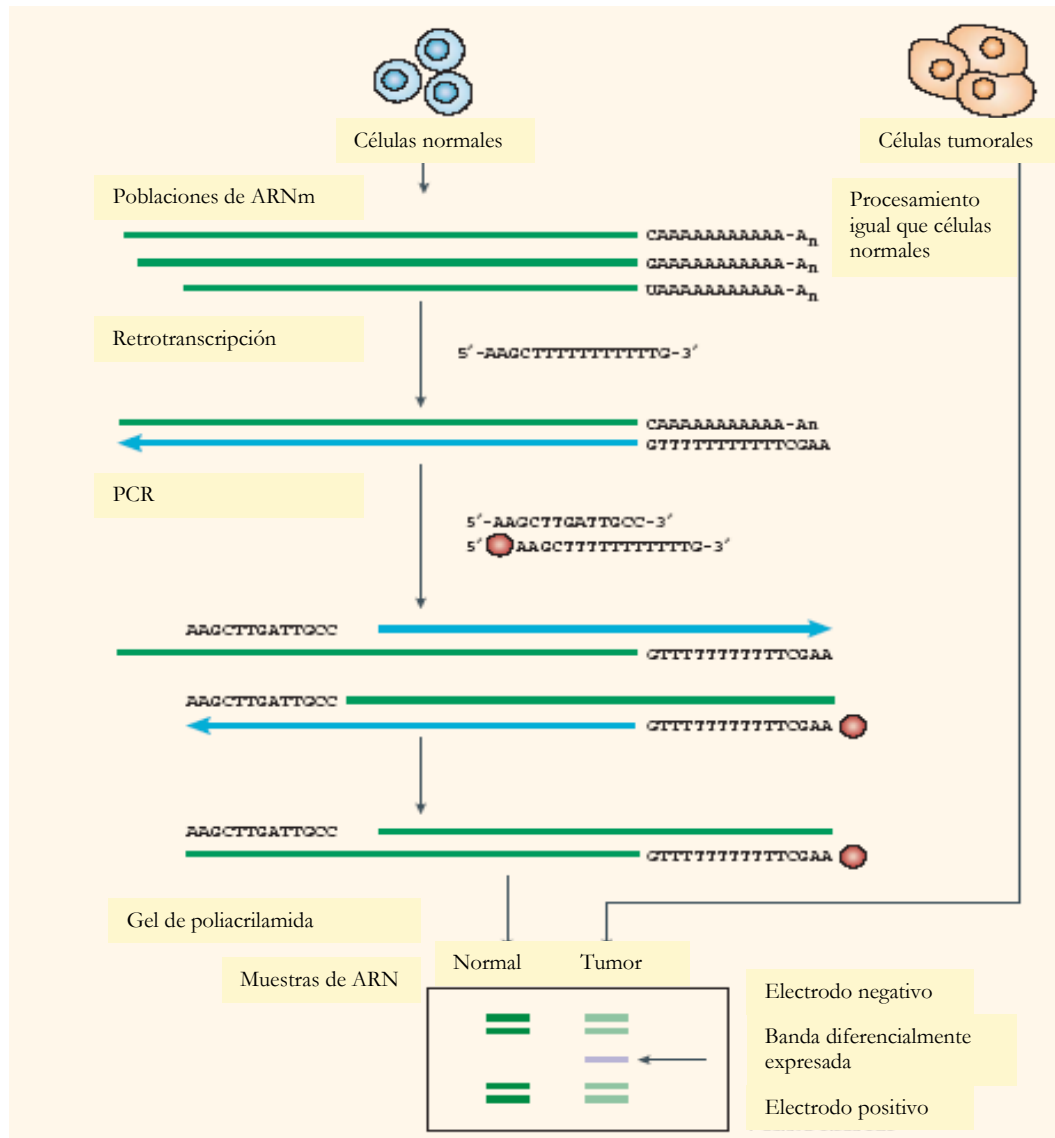
♦ **Sistemas cerrados**, definidos como aquellos en que los genes a estudiar son finitos y pertenecientes a un sistema ya definido, y previamente descritos. Esta metodología se emplea en genomas muy conocidos. Como ejemplo de sistemas cerrados para el estudio de la expresión de genes tenemos las técnicas de Northern Blot, Microarrays y PCR cuantitativa o a tiempo real.

♦ **Sistemas abiertos**, definidos como aquellos que no requieren ningún conocimiento previo del genoma ni del perfil transcripcional. En estos sistemas es adecuada la utilización de bases de datos genéticas que faciliten la identificación de genes. Dentro de los sistemas abiertos nos encontramos con las técnicas de Differential Display, AFLP, RDA, SAGE, GeneCalling, TOGA y READS.

Estas dos metodologías son complementarias ya que los genes de expresión diferencial identificados mediante sistemas abiertos pueden ser posteriormente estudiados mediante sistemas cerrados.

### 3.2.1 *Differential Display*

La técnica de Differential Display fue desarrollada para el estudio del perfil genético por Liang y Pardee en 1992. Dentro del protocolo (Figura V.3.1), el ARNm de cada muestra es retrotranscrito a ADN codificante (ADNc), denominado así porque carece de las regiones intrónicas ya que se ha conseguido a partir de ARN. Para la retrotranscripción se utilizan cebadores de anclaje con una cola poli-T y dos bases adicionales en 3' que aseguran que se amplifiquen los mensajeros por subpoblaciones, generando así un número manejable de ADNc. También se incorpora en el extremo 5' del cebador poli-T una secuencia de 11 o 12 nucleótidos que permite la secuenciación posterior sin necesidad de subclonar. Después el ADNc es amplificado por PCR utilizando una combinación de los mismos cebadores de anclaje poli-T y cebadores arbitrarios de pequeño tamaño que se unirán a numerosas zonas del gen. Cada cebador arbitrario incorpora 10 nucleótidos para unirse al ADNc y 16 nucleótidos más que corresponden a un cebador universal que permite la secuenciación del fragmento obtenido sin necesidad de subclonar. Son necesarias combinaciones de 12 cebadores poli-T y 20 cebadores arbitrarios para exponer la 10.000 especies de ARNm presentes en la células mamarias (Liang *et al.*, 1992). Durante la reacción de PCR se marcan los productos de amplificación radiactivamente. El producto de esta amplificación es separado mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y revelado con autografías. Cada ARNm es representado por una banda y aquellas bandas que se expresan de manera diferente entre muestras, pueden ser escindidas del gel (Figura 13), reamplificadas y clonadas para poder secuenciarse. Para realizar la reacción de secuenciación se emplea el mismo cebador arbitrario con el que se consigue la banda. La secuencia obtenida, por comparación con distintas bases de datos, identifica el gen que tiene expresión diferente. Como resultado también se obtienen genes que no se encuentran en bases de datos.



**Figura V.3.1.** Esquema del protocolo de Differential Display

Desde su descripción esta técnica ha sufrido algunos cambios que han supuesto una importante mejora y se han realizado numerosas revisiones del método (Liang *et al.*, 1998; Liang *et al.*, 2000; Stein y Liang *et al.*, 2002). Se redujo de dos a una las bases adicionales en el cebador poli-T (Liang *et al.*, 1994) lo que supone una reducción drástica de la cantidad de falsos positivos y se reduce también el número de retrotranscripciones de 12 a 3 por muestra.

También se ha modificado esta técnica para evitar la utilización de radiactividad, mediante la visualización de las bandas por tinción de plata (Doss *et al.*, 1996; Gottschlich *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1999; Margaritopoulos *et al.*, 2001).

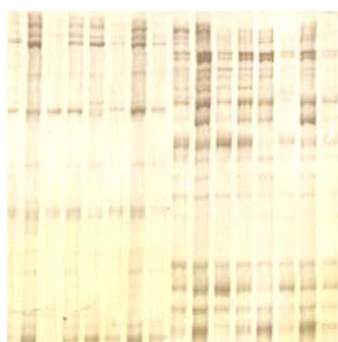
La obtención de ARNm no degradado como material de partida es muy importante. Además el ARNm no debe estar contaminado con ADN cromosómico, ya que los cebadores arbitrarios podrían amplificar fragmentos de ADN provocando la aparición de falsos positivos y



negativos (Liang *et al.*, 1995). La utilización de hexámeros al azar como cebadores en la reacción de retrotranscripción genera poblaciones de ADNc que representan el ARNm y simplifica la técnica ya que es necesaria una única reacción de retrotranscripción para cada muestra de ARNm (Sokolov *et al.*, 1994; Liang *et al.*, 1995).

Dentro de las ventajas de este método encontramos que no requiere ningún conocimiento previo del gen ni de su secuencia, por lo que es indicado para genomas desconocidos, y que es una técnica muy flexible y fácil de desarrollar en el laboratorio.

Como desventaja de la técnica podríamos citar la gran cantidad de falsos positivos, cifra que puede alcanzar el 50% (Martin y Pardee *et al.*, 2000), pero esta tasa puede ser reducida al 0,1% con un diseño y una ejecución cuidadosos.



**Figura V.3.2.** Gel de poliacrilamida: Differential Display

### 3.2.2 PCR a tiempo real

La técnica de PCR a tiempo real permite realizar análisis de expresión recogiendo los valores que se generan durante la PCR, combinando la reacción de amplificación y la detección de la misma. Esto se puede llevar a cabo mediante la utilización de distintos agentes que emiten fluorescencia y que permiten asociar la concentración del producto de la PCR con la intensidad de la fluorescencia (Higuchi *et al.*, 1993) (Figura 14). La reacción está caracterizada por el punto en el tiempo o ciclo de la PCR donde la señal de amplificación es recogida por primera vez con significación estadística, es decir que la intensidad de la fluorescencia es mayor que la fluorescencia de fondo. A este ciclo de la PCR se le denomina Ciclo Umbral o Threshold Cycle (Ct) y determina el valor de expresión del gen. De manera que a mayor cantidad de ADN o ARN en el material de partida, más rápido aumenta significativamente la señal de fluorescencia y menor es el Ct (Heid *et al.*, 1996).

Desde mediados de los 90 las empresas comerciales han desarrollado tecnologías que permiten realizar PCR a tiempo real, de manera que se puede cuantificar el nivel de ARNm de un gen concreto en cientos de muestras a la vez mediante una retrotranscripción de ARN a ADNc y su posterior amplificación. Existen distintas maneras que permiten medir la amplificación en cada

ciclo (sondas específicas, agentes intercalantes) pero siempre se realiza una medida de fluorescencia que es referida a un estándar conocido.

Cuando el material de partida es ARN la reacción puede desarrollarse en un solo paso o en dos. En un solo paso las reacciones de retrotranscripción de ARNm a ADNc y de amplificación tienen lugar en el mismo tubo, mientras que en dos pasos estas reacciones se realizan en tubos separados. Hay distintas ventajas y desventajas en los dos métodos (Wong *et al.*, 2005).

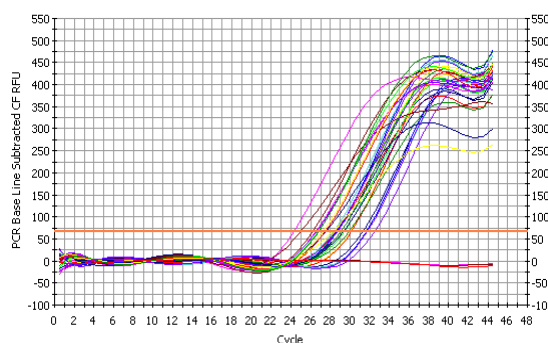
Dentro de las ventajas de su aplicación sobre otros métodos de análisis de expresión encontramos: la producción de datos cuantitativos en un registro preciso y dinámico del orden de 7 a 8 logaritmos (Morrison *et al.*, 1998), que no requiere manipulación del producto después de la amplificación (Heid *et al.*, 1996), puede detectar diferencias de expresión entre dos muestras menores a un 23% (Gentle *et al.*, 2001), tiene coeficientes de variación menores a técnicas de densitometría de bandas e hibridación de sondas (Schmittgen *et al.*, 2000), discrimina entre secuencias casi idénticas de ARNm, y requiere menor cantidad de ARNm de partida que otros métodos de análisis de expresión (Wong *et al.*, 2005). Además la técnica de PCR a tiempo real es del orden de 1000 veces más sensible que las técnicas de cuantificación por hibridación de ARN (Marinen *et al.*, 2003), pudiendo detectar una única copia de un transcrito determinado (Palmer *et al.*, 2003).

Sus desventajas son: que resulta un método caro, tanto el equipo para realizar la técnica como el análisis de un volumen elevado de genes y muestras, su extremada sensibilidad, y requiere un diseño sólido del experimento y de las técnicas de normalización de resultados para la obtención de conclusiones exactas (Wong *et al.*, 2005).

La PCR cuantitativa o a tiempo real suele utilizarse como método de validación para confirmar los niveles de expresión observados en alguno de los sistemas abiertos.

La reacción de PCR consta de cuatro fases: la fase de crecimiento lineal, la fase exponencial temprana, la fase exponencial propiamente dicha o fase lineal-logarítmica y la fase de meseta (Tichopad *et al.*, 2003). Durante la fase de crecimiento lineal, que dura aproximadamente 10-15 ciclos, la reacción está comenzando y la emisión de fluorescencia por parte de las muestras no puede ser distinguida de la fluorescencia de fondo. Los valores de referencia de fluorescencia son calculados en esta fase. En el paso siguiente la fluorescencia emitida por las muestras aumenta 10 veces la desviación estándar de los valores de referencia superando un umbral, denominado Ct, con respecto a la fluorescencia de fondo (Heid *et al.*, 1996). Durante la fase lineal-logarítmica la PCR alcanza su periodo de máxima amplificación, donde el producto de la reacción se duplicaría después de cada ciclo en condiciones óptimas. La fase de meseta comienza cuando los

reactivos se agotan y la intensidad de la fluorescencia no aporta el cálculo de datos (Bustin *et al.*, 2000).



**Figura V.3.3.** Gráfica que recoge la señal de amplificación en función de los ciclos de PCR. Muestra las fases de la PCR a tiempo real.

Muchas variables necesitan ser controladas en los análisis de expresión de genes como la cantidad de material de partida, eficiencias enzimáticas y las diferencias globales de la actividad transcripcional entre tejidos y/o células. Varias estrategias han sido aplicadas para normalizar esas variaciones (Vandesompele *et al.*, 2002). Por ello la cuantificación puede llevarse a cabo de distintas formas mediante la técnica de PCR a tiempo real:

#### ▪ Cuantificación absoluta

La cuantificación absoluta utiliza diluciones seriadas de muestras con concentraciones conocidas para generar una recta patrón. La recta patrón relaciona linealmente el Ct con la cantidad inicial de ARN total o ADNc, permitiendo conocer la concentración de muestras desconocidas según su Ct (Heid *et al.*, 1996). Este método asume que todas las muestras estándar y desconocidas poseen la misma eficiencia de amplificación (Souaze *et al.*, 1996). La concentración de las diluciones seriadas debe ser similar a la concentración del resto de las muestras y permanecer en un rango detectable y cuantificable para el experimento y el aparato de detección (Wong *et al.*, 2005).

#### ▪ Cuantificación relativa

En la cuantificación relativa las variaciones de expresión de las distintas muestras para un gen son referenciadas tanto a los valores de una muestra estándar, como a los valores de expresión para esas muestras de un gen de referencia o “housekeeper” (Livak *et al.*, 2001). El gen housekeeper es un calibrador, y los resultados son dados como la relación entre el valor de la

muestra problema y el valor de esa muestra para el gen de referencia. Existen distintos modelos matemáticos para normalizar la expresión génica de forma relativa. Dependiendo del método empleado se pueden obtener distintos resultados con errores estándar distintos (Liu *et al.*, 2002; Muller *et al.*, 2002).

La realización de la técnica de PCR a tiempo real requiere un serie de pasos previos:

✓ **Diseño de cebadores específicos**

Los cebadores empleados en PCR a tiempo real tienen que cumplir unos requisitos en su diseño:

- el tamaño del fragmento a amplificar debe situarse entre 100 y 200 pares de bases.
- Contenido de los cebadores en G/C > 50%
- Nula formación de dímeros o estructuras secundarias
- Máxima especificidad, es decir, que de todo el genoma solo amplifique el gen en estudio.

✓ **Construcción de la recta patrón del gen a cuantificar**

Para la cuantificación se genera una curva estándar a partir de diluciones seriadas de una muestra de referencia. La elección de la muestra de referencia no es importante, pero debe ser una en la que el gen en estudio se exprese.

A partir de la recta patrón se obtienen los parámetros de eficiencia y coeficiente de correlación que deben ser al menos de un 90% y cercanos al 100%. Estos dos parámetros a esos niveles indican que la recta es suficientemente fiable como para interpolar los datos de expresión que se obtienen de las muestras. Para que la eficiencia de la PCR sea ideal la concentración del producto de la reacción debe doblarse en cada ciclo dentro de la fase exponencial (Gibson *et al.*, 1996).

✓ **Elección de un gen de referencia y construcción de su recta patrón**

Cualquier cuantificación relativa mediante PCR a tiempo real requiere de la utilización de un control endógeno invariable para corregir las variaciones en la eficiencia de la PCR entre muestras distintas y para normalizar la cantidad de muestra de partida de cada una de ellas.

La normalización de los resultados actualmente se lleva a cabo midiendo varios genes housekeepers, ya que la normalización empleando el número de células, cantidad total de ARN o un único gen control (ribosómico o no) plantea distintos problemas. Utilizando varios genes

housekeeper se calcula un factor de normalización a partir de la media geométrica de sus valores de expresión (Vandesompele *et al.*, 2002; Pfaffl *et al.*, 2004). Además se mide la estabilidad de la expresión de los distintos genes control para las muestras de interés determinando los genes housekeepers más adecuados (es decir con la expresión mas estable) para el experimento. Esto lo llevan a cabo distintas aplicaciones para Microsoft Excel, como qBase Analyzer o Bestkeeper.

### 3.2.3 Elección de las técnicas

En la elección del método a emplear se tuvo en cuenta el conocimiento del genoma a estudio; en diciembre de 2005 se publicó la secuencia completa y el análisis del genoma canino. También se consideró el interés de estudiar la expresión no solo de genes ya conocidos, sino también de nuevos genes implicados en la etiología y progresión del carcinoma inflamatorio canino. Por lo tanto nuestro interés se centro en sistema abiertos de análisis de expresión.

Dentro de los sistemas abiertos, la selección del método a utilizar tiene en cuenta en primer lugar la cantidad de material de partida que se requiere, en este caso ARN, teniendo en cuenta que se extraerá de tejido glandular mamario. En segundo lugar, debe proporcionar una alta cobertura del genoma completo para asegurar una visión global del perfil de expresión. Y por último pero de igual importancia es que la sensibilidad del método debe ser la más alta posible, lo que significa que debe ser capaz de detectar ARNm de bajo número de copias.

Los métodos seleccionados fueron:

- **Differential Display** porque en conjunto cumplía todos los requisitos que consideramos necesarios para el análisis: es un sistema abierto, su coste y la dificultad para llevarlo a cabo son bajos, requiere poca cantidad de ARN de partida, se detectan gran cantidad de genes por la gran cantidad de combinaciones de cebadores que pueden utilizarse, puede detectar genes no descritos, puede detectar ARNm que se encuentre en una proporción 1/200000 transcritos (Wan *et al.*, 1996), y el número de muestras que pueden compararse a la vez es alto.

- la técnica de **PCR a tiempo real** que nos permitía validar los resultados obtenidos mediante Differential Display y que también se empleo en el estudio de expresión diferencial de genes candidatos funcionales, ya que permitía estudiar genes previamente descritos en un genoma ya conocido detectando diferencias de expresión del 23% entre dos muestras, discriminando entre secuencias casi idénticas de ARNm. Además es una técnica que requiere menor cantidad de ARNm de partida y más sensible que otros métodos de análisis de expresión.

### 3.4 Análisis estadístico

Las técnicas estadísticas de estimación de parámetros, intervalos de confianza y prueba de hipótesis son, en conjunto, denominadas estadística paramétrica y son aplicadas básicamente a variables continuas. Estas técnicas se basan en especificar una forma de distribución de la variable aleatoria y de los estadísticos derivados de los datos. En estadística paramétrica se asume que la población de la cual la muestra es extraída es normal o aproximadamente normal. Esta propiedad es necesaria para que la prueba de hipótesis sea válida. Sin embargo, en un gran número de casos no se puede determinar la distribución original ni la distribución de los estadísticos por lo que en realidad no tenemos parámetros a estimar, solo distribuciones que comparar. Esto se llama estadística no paramétrica.

Los métodos no paramétricos son también conocidos como métodos de distribución libre ya que no se puede suponer la distribución paramétrica de los datos. Se utilizan estos métodos cuando la distribución es desconocida o cuando los datos se presentan en forma de rangos de variables aleatorias (Hollander *et al.*, 1973).

El procedimiento NPAR1WAY efectúa análisis no paramétricos llevando a cabo el análisis de la varianza de los datos y estadísticos según la función de distribución empírica.



## ***VI. OBJETIVOS***





## **VI. OBJETIVO**

La cuestión clave en el carcinoma inflamatorio mamario es la identificación de los cambios del perfil génico específico que le confieren su fenotipo característico y su agresividad. Poco se sabe de los mecanismos moleculares u biológicos del CI por varias razones; su baja frecuencia, el tamaño de la muestra recogida para el diagnóstico es tan pequeño que no permite realizar estudios moleculares, y por su tratamiento similar el CI normalmente es estudiado conjuntamente con otros tumores mamarios localmente avanzados a pesar de sus diferencias en tasas de incidencia edad-específicas, presentación clínica, histología, estatus de receptores hormonales y pronóstico (Paradiso *et al.*, 1999; Kleer *et al.*, 2000; Brenner *et al.*, 2002; Anderson *et al.*, 2003). Además los mecanismos moleculares que subyacen de esta entidad clinicopatológica distinta, deben ser estudiados comparativamente (Lerebours *et al.*, 2005).

Así el objetivo del estudio es el análisis de la expresión génica del carcinoma inflamatorio canino respecto a tejido mamario sano y carcinomas distintos al carcinoma inflamatorio de la misma especie, con dos vertientes; el estudio de genes conocidos candidatos funcionales y el estudio de expresión génica mediante sistemas abiertos, que permiten el análisis de expresión sin conocimiento previo de los genes analizados.



## ***VII. MATERIAL Y MÉTODOS***



## **VII. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **1 MATERIAL BIOLÓGICO**

El material biológico empleado en el estudio consta de biopsias y necropsias de tejido mamario recogidas en el Hospital Clínico Veterinario de Madrid (HVM), procedentes de 23 hembras de la especie canina, y dentro de las cuales podemos diferenciar entre tejido mamario sano, carcinomas mamarios y carcinomas inflamatorios mamarios caninos.

#### **1.1 Criterios de selección de casos**

Los casos de carcinoma inflamatorio canino fueron diagnosticados en el HVM, atendiendo a las características clínicas descritas previamente en la especie canina (Susaneck *et al.*, 1983) y en la especie humana (Tavassoli *et al.*, 1999), confirmándolo mediante el estudio histológico de una biopsia tomada mediante tru-cut. Los pacientes no fueron eutanasiados cuando se realizó el diagnóstico, si no prescritos con un tratamiento paliativo hasta la absoluta falta de respuesta.

En el HVM también fueron seleccionados animales que presentaban nódulos en la región mamaria con características clínicas compatibles con tumores mamarios caninos distintos del CI. Estos pacientes fueron quirúrgicamente tratados, siendo mastectomizados y ovariectomizados. De todos los casos se recogieron datos epidemiológicos, reproductivos y clínicos, incluyendo el examen radiológico del tórax.

Los animales control incluidos en el estudio estaban libres de toda enfermedad.

Siempre se seleccionaron hembras con una edad superior a 2 años y en estado de anestro, determinado el estado del ciclo reproductivo mediante frotis vaginal.

#### **1.2 Recogida de muestras**

Se biopsió el tejido mamario sano mediante tru-cut, obteniendo muestras con 1 cm de diámetro. Las muestras de tumores mamarios distintos al CI se recogieron a partir de las mastectomías parciales o totales de los casos diagnosticados previamente como posibles tumores mamarios. La recogida de muestras de carcinomas inflamatorios se realizó a partir de necropsias de animales eutanasiados, previamente diagnosticados clínicamente e histológicamente, recogiendo los hallazgos macroscópicos.

### 1.3 Clasificación histológica

El diagnóstico clínico se confirmó mediante técnicas histológicas. Para su realización, un fragmento de las biopsias y necropsias fue fijado en formalina al 10%, procesado en parafina, cortado en secciones de 4  $\mu\text{m}$  y teñido con hematoxilina-eosina, según métodos rutinarios. También se realizaron tinciones específicas para la observación de lípidos (Sudan III). A continuación se clasificaron histológicamente. Los tumores mamarios caninos (incluyendo el CI) fueron diagnosticados siguiendo el sistema de clasificación de tumores mamarios caninos (Misdorp *et al.*, 1999). Se siguió la patología del cáncer humano (Tavassoli *et al.*, 1999) como criterio histológico para el diagnóstico de los carcinomas ricos en lípidos. En cada tumor el grado histológico de malignidad fue establecido puntuando la formación de túbulos, el pleomorfismo celular y la tasa de mitosis, del 1 al 3, según el sistema de gradación humano (Elston *et al.*, 1993). Aparte se evaluaron otras características histológicas del parénquima y del estroma.

Se realizó también el examen microscópico de la piel ante la posible infiltración neoplásica de la misma. La invasión masiva de células neoplásicas de los vasos linfáticos es una característica histológica diagnóstica en el CI.

Finalmente las muestras se clasificaron histológicamente en 11 muestras de carcinoma inflamatorio canino espontáneo, 6 muestras de tumores mamarios caninos espontáneos de grado histológico de malignidad III y 6 muestras de tejido mamario sano procedentes de animales libres de enfermedad.

### 1.4 Conservación de las muestras

Las muestras fueron sumergidas en RNAlater (SIGMA) durante 24 horas, solución que evita la degradación del ARN tisular debida a las RNAsas presentes en el medio, y a continuación fueron congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su conservación.

## 2 MÉTODOS EXPERIMENTALES

### 2.1 Extracción de ARN

A partir del tejido mamario conservado a  $-80^{\circ}\text{C}$ , se realizó la extracción del ARN total, mediante el kit de Extracción RNeasy® Midi Kit (QIAGEN), siguiendo el protocolo prescrito para muestras tisulares. Se utilizaron 100 mg de tejido mamario para la extracción. Durante el protocolo de aislamiento de ARN total se procedió a realizar un tratamiento con DNAsa (RNase-Free DNase Set, QIAGEN) para la eliminación del ADN.

Para asegurar la calidad del ARN fue necesario evitar su degradación, y por ello fueron adoptadas una serie de condiciones de trabajo, como la utilización de guantes, puntas con filtro, fungibles y soluciones libres de RNAsas, y superficies y material de laboratorio tratado con productos inhibidores de la RNAsas (RNaseZap®, Ambion).

### 2.2 Calidad, cantidad y pureza de ARN

Se chequeó la integridad del ARN extraído mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en buffer TBE1x (Tris-HCl 90mM, ácido bórico 90mM, EDTA 2mM pH=8), bajo un campo eléctrico de 100V durante 20 minutos.

Se determinó el ARN total mediante espectrofotometría, midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 260nm ( $A_{260}$ ). A esta longitud de onda una absorbancia de 1 unidad corresponde a una concentración de 40 ng/ $\mu\text{l}$ .

La relación  $A_{260}/A_{280}$  estima la pureza del ARN con respecto a contaminantes como las proteínas. Las medidas fueron tomadas en Tris-HCl 10mM pH=7,5. Valores entre 1,8 y 2 indican que el ARN está libre de impurezas.

### 2.3 Reacción de retrotranscripción

A partir del ARN previamente extraído se realizó la reacción de retrotranscripción o transcripción inversa, mediante la retrotranscriptasa iScript™ cDNA Synthesis Kit (BIORAD). En esta reacción las moléculas de ARN son copiadas a moléculas de ADN codificante (ADNc).

El ADNc, al igual que el ARN maduro, no contiene intrones, pero es una molécula más estable, que requiere unas condiciones de trabajo menos restrictivas. El protocolo y programa de amplificación para la realización de la reacción se detalla en las Tablas VII.2.1 y VII.2.2.



	Volumen por reacción
<i>MIX</i>	4µl
<i>Retrotranscriptasa</i>	1µl
<i>ARN</i>	2µl
<i>H<sub>2</sub>O</i>	13µl

Tabla VII.2.1. Protocolo de la reacción de transcripción inversa.

<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Tiempo</i>
25°C	5 minutos
42°C	30 minutos
85°C	5 minutos
4°C	

Tabla VII.2.2. Programa de amplificación de la reacción de transcripción inversa.

## 2.4 Differential Display

Esta técnica, empleada para el análisis de expresión, se realiza en varios pasos, que incluyen una reacción de retrotranscripción para la obtención de ADNc, amplificación de fragmentos utilizando cebadores aleatorios mediante PCR, separación de los productos de la PCR mediante electroforesis vertical en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes y posterior tinción de plata del gel para la observación de los fragmentos.

Para realizar el experimento se emplearon *pools* de ARN de cada uno de los fenotipos. Los *pools* fueron contruidos a partir de 2 µl de ARN de cada individuo.

### 2.4.1 Amplificación de ADNc

Después de la reacción de retrotranscripción y una vez obtenido en ADNc, se utilizaron distintas combinaciones de cebadores poli-T (Tabla VII.2.3) y cebadores arbitrarios (Tabla VII.2.4) para la amplificación de fragmentos mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Cebador	Secuencia
T7(dT <sub>12</sub> )A	5'-ACG ACT CAC TAT AGG GCT TTT TTT TTT TTA-3'
T7(dT <sub>12</sub> )C	5'-ACG ACT CAC TAT AGG GCT TTT TTT TTT TTC-3'
T7(dT <sub>12</sub> )G	5'-ACG ACT CAC TAT AGG GCT TTT TTT TTT TIG-3'

**Tabla VII.2.3.** Secuencias de los cebadores poli-T utilizados en Differential Display.

Cebador	Secuencia
M13-ARP1	5'-ACA ATT TCA CAC AGG ACG ACT CCA AG-3'
M13-ARP2	5'-ACA ATT TCA CAC AGG AGC TAG CAT GG-3'
M13-ARP3	5'-ACA ATT TCA CAC AGG AGA CCA TTG CA-3'
M13-ARP4	5'-ACA ATT TCA CAC AGG AGC TAG CAG AC-3'
M13-ARP5	5'-ACA ATT TCA CAC AGG AAT GGT CGT CT-3'
M13-ARP6	5'-ACA ATT TCA CAC AGG ATA CAA CGA GG-3'
M13-ARP7	5'-ACA ATT TCA CAC AGG ATG GAT TGG TC-3'
M13-ARP8	5'-ACA ATT TCA CAC AGG ATG GTA AAG GG-3'
M13-ARP9	5'-ACA ATT TCA CAC AGG ATA AGC CTA GC-3'
M13-ARP10	5'-ACA ATT TCA CAC AGG ACA GTG TGT GA-3'
M13-ARP11	5'-ACA ATT TCA CAC AGG AAC GCT AGT GT-3'
M13-ARP12	5'-ACA ATT TCA CAC AGG AGG TAC TAA GG-3'
M13-ARP13	5'-ACA ATT TCA CAC AGG AGT TGC ACC AT-3'
M13-ARP14	5'-ACA ATT TCA CAC AGG ATC CAT GAC TC-3'
M13-ARP15	5'-ACA ATT TCA CAC AGG ACT TTC TAC CC-3'
M13-ARP16	5'-ACA ATT TCA CAC AGG ATC GGT CAT AG-3'
M13-ARP17	5'-ACA ATT TCA CAC AGG ACT GCT AGG TA-3'
M13-ARP18	5'-ACA ATT TCA CAC AGG ATG ATG CTA CC-3'
M13-ARP19	5'-ACA ATT TCA CAC AGG ATT TTG GCT CC-3'
M13-ARP20	5'-ACA ATT TCA CAC AGG ATC GAT ACA GG-3'

**Tabla VII.2.4.** Secuencias de los cebadores arbitrarios utilizados en Differential Display.

La reacción se llevó a cabo con la polimerasa AmpliTaq Gold (Applied Biosystem), según las condiciones detalladas en Tablas VII.2.5 y VII.2.6.

	[INICIAL]	[FINAL]	VOLUMEN
<i>Buffer</i>	10x	1x	1µl
<i>Cl<sub>2</sub>Mg</i>	25mM	2mM	0,8µl
<i>dNTPs</i>	10mM	1mM	1µl
<i>Cebador dT</i>	10µM	1µM	1µl
<i>Cebador arbitrario</i>	10µM	1µM	1µl
<i>Taq Gold</i>	5U/µl	1U	0,2µl
<i>ADNc</i>			2µl
<i>H<sub>2</sub>O</i>			3,1µl

**Tabla VII.2.5.** Concentración inicial, concentración final y volúmenes de la reacción de amplificación.

Temperatura (°C)	Tiempo	
95°C	8 s	
94°C	30 s	
40°C	1 s	
72°C	2 s	3 ciclos
92°C	30 s	
40°C (1°C + por ciclo)	30 s	
72°C	2 s	18 ciclos
94°C	40 s	
58°C	50 s	
72°C	2 s	21 ciclos
72°C	7 s	
5°C		

**Tabla VII.2.6.** Protocolo de amplificación.

### 2.4.2 Electroforesis

Los fragmentos de la PCR fueron separados mediante electroforesis vertical en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.

Antes de poder realizar la electroforesis existen una serie de pasos previos que fueron realizados para la obtención del gel de poliacrilamida. Los cristales entre los cuales polimeriza el

gel fueron tratados previamente por su cara interna: uno de los cristales con una capa de Bind Silane (Amersham-Pharmacia), que facilita la posterior recuperación del gel, y otro cristal con una solución Repel (Amersham-Pharmacia), que asegura que el gel no se quedará adherido a este cristal.

Los geles estaban compuestos por Acrilamida-bisacrilamida en una proporción 19:1 6%, Urea 7M, TBE 0,5x, Persulfato Amónico 0,7% y TEMED 0,2%.

El buffer de electroforesis utilizado fue TBE 1x.

Se calentó el gel previamente a la electroforesis 45 minutos a 90W.

A los fragmentos de PCR se les añadió tampón de carga, consistente en EDTA 0,5M pH=8, Xilén-cyanol 0,05% y Azul de bromofenol 0,005%. Posteriormente se desnaturalizaron a 95°C durante 5 minutos y se cargaron en el gel. La electroforesis duró 4h a 60W y 1350-1500V.

### 2.4.3 Tinción

El gel de poliacrilamida se sometió a un proceso de tinción con nitrato de plata, basado en el protocolo de Bassam *et al.*, (1991) ligeramente modificado, para la visualización de los fragmentos amplificados y separados mediante electroforesis. El protocolo consta de los siguientes pasos:

- Fijación del gel en una solución de ácido acético al 10% durante 3 minutos.
- Lavado con H<sub>2</sub>O MiliQ.
- Tinción (AgNO<sub>3</sub> 0,2%; Formaldehído 37%) con agitación y oscuridad durante 20 minutos.
- Lavado del gel con H<sub>2</sub>O MiliQ.
- Revelado con una solución que contiene Carbonato sódico (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 0,07M, Tiosulfato sódico (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·x5 H<sub>2</sub>O) al 1% y Formaldehído al 37%, hasta la visualización de las fragmentos de la PCR en forma de bandas.
- Lavado con H<sub>2</sub>O MiliQ.
- Paro del revelado con Ácido acético glacial al 10% durante 3 minutos.
- Lavado con H<sub>2</sub>O MiliQ y solución con Glicerol al 0,5% para su posterior conservación.
- Secado total del gel entre dos hojas de papel celofán.

#### 2.4.4 Selección de la bandas diferenciales

Se seleccionaron aquellos fragmentos o bandas en las cuales se apreciaba diferencia de intensidad o, presencia o ausencia entre los distintos grupos de muestras o de animales previamente establecidos. Los distintos grupos de animales se correspondían con: animales con CI, con carcinomas distintos al CI y sanos. Y se repitieron los experimentos en los que se observaban diferencias de expresión entre los distintos fenotipos para confirmar que no se trataba de artefactos de la PCR ni amplificaciones inespecíficas.

#### 2.4.5 Recuperación de bandas

Consiste en recuperar del gel de poliacrilamida las bandas seleccionadas para su posterior reamplificación. Este proceso implica varios pasos:

- 1º) Recortar la banda seleccionada del gel con un bisturí e introducirla en un tubo Eppendorf con 80 µl de H<sub>2</sub>O.
- 2º) Someter los tubos a 95°C durante 15 minutos.
- 3º) Mantenerlos a -70°C durante 45 minutos.
- 4º) Permitir la descongelación a temperatura ambiente.
- 5º) Volver a congelar a -70°C durante 15 minutos.
- 6º) Descongelar a temperatura ambiente.

Previamente a la reacción de reamplificación se centrifugó durante 2 minutos a 12000rpm.

#### 2.4.6 Reamplificación de la bandas

Se reamplificaron los fragmentos o bandas mediante PCR en las condiciones mostradas en las Tablas VII.2.7 y VII.2.8.

	[INICIAL]	[FINAL]	VOLUMEN
<b>Buffer</b>	10x	1x	1µl
<b>Cl<sub>2</sub>Mg</b>	25mM	1,5mM	0,6µl
<b>dNTPs</b>	10mM	0,2mM	0,2µl
<b>Cebador dT</b>	10µM	1µM	1µl
<b>Cebador arbitrario</b>	10µM	1µM	1µl
<b>Taq Gold</b>	5U/µl	1U	0,2µl
<b>ADNc</b>			3µl
<b>H<sub>2</sub>O</b>			3µl

Tabla VII.2.7. Concentración inicial, concentración final y volúmenes de la reacción de reamplificación.

Temperatura (°C)	Tiempo
95°C	5 segundos
95°C	15 segundos
60°C	15 segundos
72°C	15 segundos 25 ciclos
72°C	5 segundos
15°C	2 segundos
58°C	50 segundos

**Tabla VII.2.8.** Protocolo de temperatura de la reacción de reamplificación.

#### **2.4.7 Aislamiento de las bandas**

Para evidenciar la reamplificación de las bandas se cargaron 3 µl de la PCR conjuntamente con 1 µl de tampón de carga, en un gel de poliacrilamida 19:1 al 6% no desnaturizante. El buffer de electroforesis utilizado fue TBE1x y la electroforesis duró 2 horas a 150V y 28mA.

Se observaron dos tipos de resultados:

- a. Presencia de bandas únicas y del tamaño esperado. En este caso se purificó la PCR para proceder a su secuenciación.
- b. Presencia de bandas dobles o múltiples. En cuyo caso se vuelve a recortar, para aislar la banda seleccionada, y se repite otra vez el proceso de reamplificación y aislamiento hasta conseguir una banda única.

#### **2.4.8 Purificación del producto de PCR**

La purificación del producto de PCR persigue eliminar aquellos componentes de la PCR distintos a los fragmentos deseados. Para realizar este proceso se utilizó el kit High Pure PCR Product Purification (ROCHE).

#### **2.4.9 Secuenciación**

Una vez obtenida una banda única y en cantidad suficiente, se procedió a su secuenciación en el secuenciador automático ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). En las

reacción de secuenciación se utilizó BigDye® Terminador v3.1 Cycle Sequencing Kit y el mismo cebador arbitrario con el cual se obtuvo cada una de las bandas en Differential Display, bajo las condiciones señaladas en las Tablas VII.2.9 y VII.2.10.

	VOLUMEN
MIX	4 µl
Cebador ARP	0,5 µl
PCR	6 µl

**Tabla VII.2.9.** Condiciones de la reacción de secuenciación.

Temperatura (°C)	Tiempo
96°C	30 segundos
50-55°C (dependiendo del fragmento)	15 segundos
60°C	4 minutos      30 ciclos
4°C	

**Tabla VII.2.10.** Programa de la reacción de secuenciación.

#### 2.4.10 Purificación de la reacción de secuenciación

Mediante la purificación se eliminaron residuos tales como sales y restos de terminadores que pueden afectar a la señal fluorescente. Los pasos seguidos fueron:

- Añadir por cada 10µl de PCR de secuenciación: 1,5 µl de Acetato sódico 3M pH=4,6, 31,25 µl de Etanol 100%, y 7,5 µl de H<sub>2</sub>O.
- Mantener 15 minutos a 4°C para que precipiten los productos de extensión de la PCR.
- Centrifugar 30 minutos a 13000rpm. Eliminar el sobrenadante.
- Añadir 250 µl de Etanol 75%.
- Centrifugar 15 minutos a 13000rpm. Eliminar el sobrenadante y permitir el secado.

Por último se añadieron 25 µl de Formamida y se cargó en el secuenciador, donde se somete a una electroforesis capilar utilizando, durante 40 minutos, Polímero POP7 (Applied

Biosystems). Una vez finalizada la electroforesis los resultados son analizados por el programa Sequencing Analysis Software (Applied Biosystems), que genera un electroferograma y una secuencia.

#### **2.4.11 Análisis de la secuencias**

Para conocer a qué gen corresponden y las características de cada una de las secuencias obtenidas, se recurrió a una serie de herramientas y bases de datos presentes en la red, y a la información existente sobre dichos genes en la especie canina y humana. Dentro de estas bases de datos se utilizaron:

- NCBI (National Centre of Biotechnology Information); <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- UCSC Genome Bioinformatics (University of California Santa Cruz Genome Bioinformatics); <http://genome.ucsc.edu/>
- TIGR (The Institute of Genomic Research); <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/>

### **2.5 Real Time PCR o PCR cuantitativa**

Esta técnica permite la confirmación de la expresión diferencial de los genes encontrados mediante Differential Display. Además se empleó para cuantificar la expresión génica de genes candidatos funcionales de forma relativa entre los fenotipos.

El material de partida de esta técnica fue el ARN total de cada uno de los animales a estudio que fue retrotranscrito a ADN codificante. También fueron retrotranscritos y analizados *pools* de ARN de cada uno de los fenotipos, contruidos a partir de 2 µl de cada individuo. La reacción se llevó a cabo en el termociclador iCycler TN (BIORAD), empleando DyNAmo™ HS SYBR® Green qPCR Kit (FINNZYMES) que contiene el fluoróforo SybrGreen. Las reacciones se hicieron por duplicado para cada individuo y gen. Se incorporaron controles negativos al experimento, con los mismos componentes de reacción pero sin sustrato. Las cantidades empleadas y el programa del termociclador se describen en las Tablas VII.2.11 y VII.2.12.



	[INICIAL]	[FINAL]	VOLUMEN
<b>MIX</b>	10x	1x	10 µl
<b>Cebador Forward</b>	10µM	0,5µM	1 µl
<b>Cebador Reverse</b>	10µM	0,5µM	1 µl
<b>ADNc</b>			2 µl
<b>H<sub>2</sub>O</b>			6 µl

**Tabla VII.2.11.** Concentración inicial, concentración final y volúmenes de la PCR.

Temperatura (°C)	Tiempo	
95°C	8 minutos	
95°C	15 segundos	
55-68°C (dependiendo del fragmento)	30 segundos	
72°C	40 segundos	45 ciclos
95°C	4 minutos	
68°C	1 minutos	
68°C (0,2°C+por ciclo)	10 segundos	155 ciclos
15°C	1 minuto	

**Tabla VII.2.12.** Programa de amplificación de la PCR cuantitativa.

El último paso del programa de temperaturas permite la construcción de una curva de disociación o “melting” con la que se comprobó la amplificación del fragmento esperado.

La fluorescencia emitida fue cuantificada dando una medida de la cantidad amplificada.

### 2.5.2 Diseño de cebadores

Para diseñar los cebadores se utilizaron los programas:

- Primer3; [http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) (Rozen *et al.*, 2000).
- Operon; <https://www.operon.com/oligos/toolkit.php?>.
- DINAMelt; <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/hybrid/twostate.php>. (Markham *et al.* 2005).

Las secuencias de los cebadores para los genes candidatos funcionales fueron las siguientes:

Gen	Cebador For	Cebador Rev
ARN	5'-GCTACCTGGCTCTGGATGAG-3'	5'-GGCAGCTGAGTCATTCTCGT-3'
ARZ	5'-GTCTGATCTGCGGTGATGAA-3'	5'-GAGGCGACAAGATGGACAAT-3'
ARC	5'-GACCAGATGGCAGTCATTC-3'	5'-AGGTCAGGGGCGAAGTAGAG-3'
ESR2N	5'-AGACCACGAGCCCAAATGTG-3'	5'-GTGACGACTGGCAATTGGATG-3'
ESR2Z	5'-CCAAGTTCAAAGAGGGATGC-3'	5'-CTTCACACGACCAGACTCCA-3'
ESR2C	5'-GGATGGAGGTGCTAATGGTG-3'	5'-GAACGAGGTCTGGAGCAAAG-3'
ESR1	5'-CATGATGAAAGGCGGGATAC-3'	5'-ATCTCCAGAGGACCCACTT-3'
Desmolasa	5'-CAATGGCTGGCTAAACCTG-3'	5'-ATAAACCGACTCCACGCTGC-3'
Aromatasa	5'-CCTCGTGCGTATGGTAACAG-3'	5'-ACCCAGTTCGTGTGCTGACTT-3'
STS	5'-ATGACCTGATGCCGCTACTT-3'	5'-GAACTTGGGCGTGAAGAAGA-3'
EST	5'-GTGAGCGAGATCCTGGACAT-3'	5'-AATCCCTGGAGCCTTGAAC-3'
SULT1A1	5'-GAAGTGTCTTATGGGTCTTG-3'	5'-GGGTCTCTTTTCATGTCCTC-3'
HSD1	5'-ACCTCTTCTCCAGCTACCG-3'	5'-AGACCTCCGTCACCTCCT-3'
HSD2	5'-GGTATTTGTGGGAGTTCTGG-3'	5'-GGCGTCTTTTATCTGTTGCT-3'
THBS1	5'-GAACCACACCAGAAGCCATT-3'	5'-GCTGGAGCCATTTACCACAT-3'
ENG	5'-AGGAGTCAACACCACGGAAC-3'	5'-AGCTCAGCGATAGACGCAAT-3'
ESAM	5'-GTGTTGGCGTACATCAGTGG-3'	5'-CATTCACAGAGCAGCGGTAG-3'
PECAM1	5'-ATGACTCCAGCTCCGAGGTA-3'	5'-GTGTCTTTTGTGTGGGTTGTC-3'
CD47	5'-GTCATTGTCGGAGCCATTCT-3'	5'-GTCCAACCACAGAGAGCACA-3'
FNI	5'-AGACCTGGGAAAAGCCGTAT-3'	5'-CGGTTATCCTTCTTGCTCCA-3'
CDH5	5'-CAGCCCTTCTACCACTTCCA-3'	5'-ATATCCAATGCTCCGACGAG-3'
VFOS	5'-CTCGTACTCCAACCGCATCT-3'	5'-GTAGTCGGCGTTGAAACCAG-3'
JUN	5'-ACGACCTTCTACGACGATGC-3'	5'-GTTCAGGGTCATGCTCTGCT-3'
PIK3R1	5'-ACGAGAAGACCTGGAACGTG-3'	5'-AAGCGTAGCAGCCCTGTTTA-3'
MYC	5'-CGACTCGGAGGAAGAACAAG-3'	5'-GCTGTGAGGAGGTTTGCTGT-3'
ERBB-2	5'-GGAAGTTCGCAGATGAGGAG-3'	5'-GCAATGATGGATGTCACAGG-3'
WISP3	5'-GTGCGAGTTCAACAGGGTA-3'	5'-AGGCTTCTTTCTGTCTGGAG-3'
CDKN1A	5'-GGAGCGATGGAACCTTGACT-3'	5'-AGGCAGGGAGACCTTGGAC-3'
COX-1	5'-GGAAGAAGCAGTTGCCAGAC-3'	5'-GTGAAGCCAGGACCCATCT-3'
COX-2	5'-CTGTTCCACCCATGTCAA-3'	5'-GCAGTTTTCGCCGTAGAATC-3'
MMP2	5'-CACGGCCAACATATGATGATG-3'	5'-GAATGCCCTTGATGTCGTCT-3'
CD35	5'-GAACCACGGTCACTTACACA-3'	5'-AAGTTTACACAGGGGAGCAG-3'
VEGFA	5'-CTATGGCAGGAGGAGAGCAC-3'	5'-GCAGGATGGCTTGAAGATGT-3'

VEGFB	5'-GTAGTGCCTCTGACTGTGGA-3'	5'-AGCTGACTGCTTGGGTAAC-3'
VEGFC	5'-GACCCCAACAAGGAAGTAGAC-3'	5'-ACACTCACAGGCACATTTTTC-3'
VEGFD	5'-CTCTGGAGATGCCGACTG-3'	5'-GCTGCCACTCCTCGTCTA-3'
VEGFR2	5'-GGGACCTAAAAACCCAGTCT-3'	5'-GAAGATTCCATGCCACTACC-3'
VEGFR3	5'-GGTCATCGCTGTCTTCTTCT-3'	5'-ACAGGTAGCCCGTCTTGATA-3'
ANGIO1	5'-AAAGGGTCACACTGGGACAG-3'	5'-GGGCACATTTGCACATACAG-3'
ANGIO2	5'-AACACTGGCTGGGAAATGAG-3'	5'-GCCGTCCCTGTAAGTCCTTT-3'
CD34	5'-GGTGGCTGATACAGAATTGT-3'	5'-AAGGCTAGAAATGTAAGTGGT-3'
TIE2	5'-CTGAAACAGCTTACCAGGTG-3'	5'-GCTATGAGCAGCATCTTCC-3'
LYVE-1	5'-GGAAGAGAAAGCCGATGATA-3'	5'-ACTGTGGTTTTGGTGGACT-3'
VWF	5'-GTGCGATATGTCACCTCAGA-3'	5'-ACTGTCACTCGGTTGGATCT-3'

Las secuencias de los cebadores para las bandas con expresión diferencial identificadas en Differential Display fueron las siguientes:

Gen	Cebador For	Cebador Rev
Banda 1	5'-ATACAGAATGGGTTCGGTGGGA-3'	5'-GGAGGACCATCCACAGAAGA-3'
Banda 5-6	5'-CCTTCCCTCACCAAACAG-3'	5'-CAGACAGGATTCCAGGAG-3'
Banda 7	5'-GGTTTCCATCACTTGTAGCC-3'	5'-GGACTTTTCTAAGGGAGGAG-3'
Banda 8-14	5'-CAAGGGTGTGTGGATGTGAA-3'	5'-GGGGCTGTACTCCTGGTTTTT-3'
Banda 9	5'-GCATGGAACAGAAAAATCC-3'	5'-TTTATCTGCTACTACATAAGTTGC3'
Banda 11	5'-CTTTTCACTTCCACCGCACT-3'	5'-TGAGATAGGTCCTGGGCAAC-3'
Banda 16	5'-TCTTAGGACTCCCACTCCAA-3'	5'-GGTAAAGGGCGTCTATGACA-3'
Banda 18	5'-GCTCAAGCCAGTCTCCAAAA-3'	5'-AAAACCAGCAAGCTCAGTGC-3'
Banda 19	5'-ATTTGATTGGAGGGGCTACC-3'	5'-AAGCTGTGGTCGCGCTAATA-3'
Banda 23	5'-AACGCCAGTAGTGACCAAGAA-3'	5'-TCCCTTTAAACACAAGGAATGAA-3'
Banda 24	5'-CTTTACAGCACGAGGGGAAG-3'	5'-CCACACCAATACTGCCATCA-3'
Banda 25	5'-GGTGGGAGAAGGGAGAAGTT-3'	5'-ATCCATCAGGAAAGCAGCAG-3'
Banda 31	5'-CAGATGAGCTTCAGGCAAGA-3'	5'-CTCCCTAAGGAAGAAGTACGA-3'
Banda 33	5'-CTTCTCTTCACCCAGGACAG-3'	5'-AAGATTGTTGATGTTTTTCC-3'
Banda 37	5'-GATGGACAGAGGTTTTTGTA-3'	5'-TAACACCAGAGGCCATAATA-3'

### 2.5.3 Construcción de la recta patrón del gen a cuantificar

Fue necesario generar una curva estándar a partir de diluciones seriadas de una muestra de referencia para poder interpolar los datos de expresión que se obtienen en el experimento. Se eligieron las diluciones  $1 \times 10^{-1}$ ,  $1 \times 10^{-2}$ ,  $1 \times 10^{-3}$ ,  $1 \times 10^{-4}$  y  $1 \times 10^{-5}$ . La reacción de amplificación se

realizó bajo las mismas condiciones descritas anteriormente para PCR cuantitativa pero por triplicado para cada una de las diluciones.

La construcción de la recta fue generada automáticamente por parte del termociclador iCycler, al igual que la eficiencia de la PCR y el coeficiente de correlación.

#### **2.5.4 Genes de referencia**

La medida de la cantidad amplificada se referenció a la expresión de varios genes constitutivos o de referencia, Gliceraldehído 3-Fosfato Deshidrogenada (GAPDH), 18S ribosómico y  $\beta$ -Actina, para normalizar las variaciones de expresión producidas por las diferencias en la extracción de ARN y en la eficiencia de la PCR entre muestras.

Estos genes fueron seleccionados por su expresión invariable entre tejidos y tratamientos.

También se construyó la recta patrón de cada uno de los genes de referencia.

#### **2.5.6 Normalización de la medida de expresión**

Las medidas de expresión de cada uno de los genes fueron normalizadas en la aplicación de Microsoft Excel qBase Analyzer (Vandesompele *et al.*, 2002). El programa emplea el modelo de cuantificación relativo delta-Ct con correcciones hechas a partir de la eficiencia de la PCR y la normalización a partir de múltiples genes de referencia.

El Ct (Threshold Cycle) determina el menor número de ciclos necesarios para alcanzar un umbral en el que la señal de fluorescencia es recogida por primer vez con significación estadística. Mediante qBase Analyzer los valores Ct de cada uno de los individuos fueron normalizados y estandarizados.



### **3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Todas las variables dependientes fueron ajustadas a un modelo lineal con una única variable independiente referente a los distintos grupos de muestras: Carcinoma Inflamatorio Canino, Carcinomas distintos al Carcinoma Inflamatorio y tejido mamario sano. Se testaron cada una de las variables dependientes mediante NPAR1WAY para encontrar diferencias significativas entre los tres distintos grupos. El procedimiento NPAR1WAY efectúa análisis no paramétricos llevando a cabo el análisis de la varianza de los datos y estadísticos según la función de distribución empírica. Todos los datos fueron procesados utilizando el software SAS System for Windows V8. Para realizar las comparaciones estadísticas el nivel de significación se estableció en 5% ( $p < 0,05$ ).



## ***VIII. RESULTADOS***





## VIII. RESULTADOS

### 1 DIFFERENTIAL DISPLAY

#### 1.1 Resultados obtenidos mediante la técnica de Differential Display.

La detección de la expresión diferencial de genes se llevó a cabo mediante la técnica Differential Display, obteniendo patrones transcripcionales distintos entre individuos de la especie canina con carcinoma inflamatorio, con carcinomas mamarios distintos al CI e individuos sanos. Después de repetir los experimentos en los que se observa variación entre los distintos tejidos, para confirmar que no son artefactos de la PCR ni amplificaciones inespecíficas, se encontraron un total de 38 bandas que presentaban diferencias en intensidad o presencia entre estos tres grupos. Se encontraron bandas presentes o que mostraban mayor intensidad en el CI que denominamos 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 16, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 y 35; y bandas presentes o con mayor intensidad en el tejido mamario sano denominadas 3, 10, 15, 17, 19, 36, 37 y 38 como queda reflejado en la Tabla VIII.1.1. Cada una de estas bandas fue obtenida de la misma o diferente combinación de cebadores poli-T y cebadores arbitrarios; y seleccionada y recuperada de los mismos o distintos geles de poliacrilamida mediante la técnica descrita en Material y Métodos. Los fragmentos presentaban tamaños diferentes que pudieron ser identificados gracias a un marcador de peso molecular cargado en el gel junto a las muestras (pBR322 DNA-Msp I Digest, BioLabs).

Banda	Tamaño	Gel	Combinación Cebadores	Mayor expresión
1	>500 pdb	17/10/2002	2-7	Carcinoma Inflamatorio
2	>500 pdb	17/10/2002	2-7	Carcinoma Inflamatorio
3	414 pdb	17/10/2002	4-6	Tejido mamario sano
4	<180 pdb	17/10/2002	2-4	Carcinoma Inflamatorio
5	180 pdb	17/10/2002	2-4	Carcinoma Inflamatorio
6	180 pdb	17/10/2002	2-4	Carcinoma Inflamatorio
7	242 pdb	25/10/2002	11-15	Carcinoma Inflamatorio
8A	242 pdb	25/10/2002	4-8	Carcinoma Inflamatorio
8B	242 pdb	25/10/2002	4-8	Carcinoma Inflamatorio
9	180 pdb	25/10/2002	2-2	Carcinoma Inflamatorio
10	307 pdb	7/10/2002	2-5	Tejido mamario sano
11	307 pdb	7/10/2002	2-5	Carcinoma Inflamatorio
12	>562 pdb	7/10/2002	11-5	Carcinoma Inflamatorio

13	242 pdb	7/10/2002	12-17	Carcinoma Inflamatorio
14A	242 pdb	18/10/2002	4-8	Carcinoma Inflamatorio
14B	242 pdb	18/10/2002	4-8	Carcinoma Inflamatorio
15	414 pdb	18/10/2002	4-8	Tejido mamario sano
16	200 pdb	18/10/2002	4-8	Carcinoma Inflamatorio
17	>562 pdb	18/10/2002	10-12	Tejido mamario sano
18	>562 pdb	10/10/2002	12-18	Carcinoma Inflamatorio
19	>562 pdb	15/10/2002	11-15	Tejido mamario sano
20	>562 pdb	10/10/2002	10-16	Carcinoma Inflamatorio
21	>562 pdb	10/10/2002	10-16	Carcinoma Inflamatorio
22	562-414 pdb	10/10/2002	10-16	Carcinoma Inflamatorio
23	562-414 pdb	10/10/2002	10-16	Carcinoma Inflamatorio
24	307-410 pdb	15/10/2002	11-15	Carcinoma Inflamatorio
25	307-414 pdb	25/10/2005	11-15	Carcinoma Inflamatorio
26	201 pdb	7/7/2006	4-9	Carcinoma Inflamatorio
27	242-307 pdb	7/7/2006	4-16	Carcinoma Inflamatorio
28	242-307 pdb	7/7/2006	4-17	Carcinoma Inflamatorio
29	127-143 pdb	10/7/2006	5-3	Carcinoma Inflamatorio
30	<143 pdb	5/7/2006	3-11	Carcinoma Inflamatorio
31	217 pdb	21/7/2006	1-3	Carcinoma Inflamatorio
32	>307 pdb	21/7/2006	1-4	Carcinoma Inflamatorio
33	160-180 pdb	21/7/2006	1-4	Carcinoma Inflamatorio
34	<201 pdb	20/7/2006	1-11	Carcinoma Inflamatorio
35	147-169 pdb	20/7/2006	6-6	Carcinoma Inflamatorio
36	190-201 pdb	20/7/2006	6-7	Tejido mamario sano
37	160-180 pdb	20/7/2006	6-7	Tejido mamario sano
38	242 pdb	20/7/2006	6-2	Tejido mamario sano

**Tabla VIII.1.1.** Bandas con expresión diferencial entre los distintos grupos de animales: denominación y tamaño del fragmento, gel del cual fueron recuperadas y combinación de cebadores del cual se obtuvo el fragmento.

Estas 38 bandas seleccionadas, reamplificadas y secuenciadas, fueron comparadas en bases de datos públicas para la identificación de los genes a los que se corresponden. Pero previamente a su selección y recuperación del gel de poliácridamida, volvieron a ser separadas en geles de poliácridamada bajo condiciones no desnaturizantes para asegurarnos de que seleccionábamos solo una banda. Para ello se emplearon geles de poliácridamida compuestos por Acrilamida-bisacrilamida en una proporción 19:1 al 6% sin Urea. Las bandas 2, 3 8, 12 y 14 se separaron en

más de un fragmento que fueron reamplificados y secuenciados individualmente como banda 2 A y 2 B, banda 3 A y 3 B, banda 8 A y 8 B, banda 12 A, 12 B y 12 C, y banda 14 A y 14 B. Algunas bandas no pudieron ser secuenciadas por su escasa concentración en ADN, como es el caso de las bandas 17, 27, 28 y 32. Por lo tanto fueron secuenciados 40 fragmentos.

Para conocer a qué gen corresponden y las características de cada una de las secuencias obtenidas se emplearon las siguientes bases de datos presentes en la red:

- NCBI (Nacional Centre of Biotechnology Information); <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- TIGR (The Institute of Genomic Research); <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/>
- UCSC Genome Bioinformatics (University of California Santa Cruz Genome Bioinformatics); <http://genome.ucsc.edu/>

Al haberse publicado en diciembre de 2005 la secuencia completa del genoma canino parcialmente anotada, se pudo en determinados casos encontrar la homología entre la secuencia de algunas bandas y la secuencia de algunos genes. En otros casos las secuencias se correspondían a parte de la secuencia de un cromosoma canino, a proteínas hipotéticas, a marcos de lectura abiertos y/o pequeños fragmentos de secuencias expresadas normalmente pertenecientes a un gen (EST). Durante la comparación de las bandas en las bases de datos se encontraron bandas que presentaban secuencias similares o iguales a otras, ya que corresponden al mismo gen, como los fragmentos 5 y 6, los fragmentos 8 (A y B) y 14 (A y B), y las bandas 20, 21, 22 y 23. Otros fragmentos no pudieron ser identificados mediante bases de datos debido a que presentaban una secuencia con muchas indeterminaciones, como las bandas 2 (A y B), 3 (A y B) y 12. Por lo tanto se obtuvieron 29 bandas totales analizadas en bases de datos.

BANDA	GenBank NCBI	blastCanino NCBI	TIGR- Dog	UCSC	Proteína
1	NW926128.1	Cfa38 NW876305.1	BU750390	Chr38:23657727-23692826	EBF-3
4				Chr21:35468572-35475127	
5-6		Cfa18 W876266.1	DN422622	AJ537186	
7				KIAA00355	LOC9710
8-14	NM206943.1	Cfa17 NW876263.1	TC66177	LTBP1	LTBP1
9	NM001007157.1	Cfa14 NW876258.1	TC50209	PHF14	PHD finger protein 14
10			TC46188	Chr4:61234442-61271922	SPINK5
11	NT007933.14	Cfa14 NW876258.1		Chr14:58426939-58457595	CAV1
13				Chr15:16852054-16910533	
15		Cfa3 NW876307.1	TC67921	Chr3:94476917-94489750	

16		Cfa22 NW876274.1	DN349758	Chr22:3869229-3945937	
18	NM001001894.1	Cfa31 NW876295.1	TC77779	TRPDI	TTC3
19	NC001807.4	NC 002008.4	TC52322	AF172776	ATP6
23	NM012433.2	Cfa37 NW876304.1	TC51898	SF3B1	SF3B1
24		Cfa9 NW876331.1	DN377558	HELTZ	HELTZ
25	NM016482.2	Cfa9NW8763311- C9orf78	TC62119	C9orf78	
26			DN269603	Chr4:54483192-54539510	
29		Cfa1 NW876270.1	DN865255	Chr75192706-75224870	
31		Cfa27 NW876284.1	DN383129	Chr27:29258480-29285618	
33		Cfa28 NW876285.1	DN409026	Chr28:39487485-39611508	
34		Cfa27 NW876284.1	TC72284	BC007552	
35			CO689556	DSEL	DSEL
36		Cfa11 NW876253.1		Chr11:55793265-55844069	
37	XM532195.2	Cfa12 NW876254.1	DN877284	DN877284	
38		Cfa14 NW876258.1	DR107326	Chr14:44163918-44352814	

**Tabla VIII.1.2.** Bandas comparadas e identificadas en bases de datos.

## 1.2 Validación de resultados mediante PCR a tiempo real

Para validar los resultados obtenidos mediante Differential Display se utilizó la técnica de PCR a tiempo real ya que permite estudiar secuencias en un genoma ya conocido detectando diferencias de expresión entre dos muestras, discriminando entre secuencias casi idénticas de ARNm. Sin embargo no se pudieron diseñar cebadores apropiados para realizar esta técnica en las siguientes bandas: 4, 10, 13, 15, 26, 29, 30, 34, 35, 36 y 38. La expresión diferencial entre los distintos grupos de animales si fue analizada para el resto de la bandas: 1, 5-6, 7, 8-14, 9, 11, 16, 18, 19, 23, 24, 25, 31, 33 y 37.

Esta técnica se inició procesando las muestras o individuos por separado, es decir realizando retrotranscripciones a partir del ARN de cada muestra y PCR a tiempo real que incluían reacciones para cada uno de los animales. Posteriormente los resultados ya normalizados se valoraban entre los distintos grupos de muestras. Sin embargo dada la cantidad de genes candidatos cuya expresión diferencial era interesante analizar, comenzamos a utilizar mezclas o “pooles” de los distintos grupos de animales. Los resultados eran normalizados mediante la utilización de tres housekeepers y la aplicación de Microsoft Excel qBase Analyzer descrita en Material y Métodos al igual que los ensayos realizados sin *pooles*. Si los resultados mostraban

diferencias de expresión entre los distintos grupos se volvía a realizar el experimento con las muestras individualizadas para obtener una significación estadística. La utilización de *pools* también nos permitía paliar los altos coeficientes de variación dentro del mismo grupo que habíamos observado en resultados previos. No obstante con el tiempo preferimos obtener también significación estadística a partir del análisis de expresión realizado con *pools*, de manera que se crearon 4 *pools* para cada uno de los grupos de animales. Estos *pools* se procesaban mediante el mismo protocolo ya descrito.

### 1.2.1 Banda 1

La secuencia de la banda 1 se correspondía con parte de la secuencia del cromosoma 38 canino. En la especie humana esta banda fue situada dentro de la región del cromosoma 1 (Hsa 1q23.3) donde se ubica el gen OLFML2B, también denominado Olfactomedin-like 2B.

Los resultados obtenidos mediante *pools* de ARNm correspondientes a los distintos grupos de animales después de su normalización y estandarización en la aplicación de Microsoft Excel qBase Analyzer fueron los siguientes:

	Banda 1
Carcinoma Inflamatorio	1
Carcinomas no CI	0,70
Tejido sano	0,74

En los resultados obtenidos del análisis de expresión realizado mediante PCR a tiempo real de forma individual se obtuvo una mayor expresión de la banda en el carcinoma inflamatorio ( $p=0,05$ ).

### 1.2.2 Banda 5-6

La secuencia de las bandas 5 y 6 no se correspondía con la secuencia de un gen completamente caracterizado, sin embargo si se correspondía en varias bases de datos con parte de varias secuencias expresadas (EST) en la especie canina. Una *Expressed Sequence Tag* o EST es una sub-secuencia corta dentro de una secuencia nucleotídica transcrita que se puede traducir o no (Adams *et al.*, 1991). Las EST son generadas por la secuenciación de ARNm clonado. La secuencia resultante es un fragmento de aproximadamente 500 a 800 nucleótidos que representa una porción de gen que se expresa. En las bases de datos pueden aparecer como secuencias de

ADNc o como ARNm. Las ESTs pueden ser situadas en sus localizaciones cromosómicas mediante técnicas físicas de mapeo como los mapas híbridos de radiación o mediante técnicas de hibridación *in situ* por fluorescencia.

En el caso de los fragmentos 5 y 6 se encontraron varias secuencias expresadas o EST cuyas secuencias eran similares a la secuencia de las bandas, como las denominadas AJ537186, DN422622, DN752171 o DN376901. Sin embargo todavía no hay información referente al gen al que podrían corresponder estas secuencias.

En el análisis de expresión realizado mediante PCR a tiempo real ( $p=0,12$ ) se observó una tendencia hacia una menor expresión de esta banda en el CI y sobre todo en tumores no CI.

### 1.2.3 Banda 7

La banda 7 se corresponde con la secuencia de una proteína hipotética identificada como LOC9710 en la especie humana. La secuencia aminoacídica de la proteína se ha ubicado en el cromosoma 1 mediante el software N-SCAN (Gross *et al.*, 2006)

En el análisis de expresión realizado mediante PCR a tiempo real se observó la inhibición de esta banda en el CI, aunque no se obtuvieron resultados significativos ( $p=0,38$ ).

### 1.2.4 Banda 8-14

Las bandas 8 y 14 representaban la secuencia parcial del gen LTBP1 que codifica la proteína latente 1 asociada a TGF beta. Esta proteína de secreción extracelular interviene en la ruta metabólica del factor de crecimiento transformante beta (TGF beta).

Los resultados obtenidos del análisis de expresión realizado mediante PCR a tiempo real de forma individual no muestran una diferencia de expresión entre los distintos grupos de animales ( $p=0,79$ ).

Los resultados obtenidos mediante *pools* de ARNm fueron los siguientes:

	Banda 8-14
Carcinoma Inflamatorio	1
Carcinomas no CI	0,95
Tejido sano	2,89

### 1.2.5 Banda 9

Se identificó la secuencia de la banda 9 dentro del gen PHF14, encontrando en el análisis de expresión realizado mediante PCR a tiempo real de forma individual una menor expresión de la banda en el CI ( $p=0,04$ ).

El locus PHF14 codifica la proteína denominada PHD proteína 14. Se ha descrito que este gen se expresa en condiciones normales en gran cantidad. Parece que participa en procesos de regulación de la transcripción ADN independientes, sin embargo no se conocen las funciones de la proteína, aunque sí sus localizaciones citoplasmática, nuclear y extracelular. La proteína contiene el dominio PHD consistente en un motivo similar a los dedos de Zinc C4HC3 encontrado en proteínas nucleares, que parece estar implicado en la regulación de la transcripción mediada por la cromatina. Además el dominio PHD parece actuar en las interacciones proteicas, estando involucrado en procesos de ubiquitinización y ensamblaje de complejos proteicos (Matthews *et al.*, 2002).

### 1.2.6 Banda 11

La secuencia de la banda 11 forma parte del gen Caveolin 1 (CAV1) implicado en la progresión del ciclo celular. Su expresión diferencial medida entre los distintos grupos de muestras mediante PCR a tiempo real no mostró resultados estadísticamente significativos ( $p=0,13$ ), pero se observaba sobre-expresión en el CI y en los carcinomas distintos del CI (CI=11,27; Carcinomas no CI=16,57; tejido mamario sano=8,83). Sin embargo los resultados del análisis de expresión realizado en los *pools* de los distintos grupos de muestras mostraba inhibición en la expresión de la banda en el CI:

	Banda 11
Carcinoma Inflamatorio	1
Carcinomas no CI	1,41
Tejido sano	7,12

### 1.2.7 Banda 16

La secuencia de la banda 16 se ha identificado dentro del gen CG11164 caracterizado en la especie *Drosophila melanogaster*. Este gen aún no ha sido ubicado en la especie canina.



No se obtuvieron resultados significativos en el análisis de expresión realizado mediante PCR a tiempo real ( $p=0,25$ ), aunque se encontró una tendencia hacia la sobre-expresión de esta banda en los carcinomas distintos del CI.

### 1.2.8 Banda 18

La banda 20 se corresponde a un dominio de repetición del tetratricopéptido TTC3. El gen TTC3 también denominado dominio de repetición del tetratricopéptido 3 se encuentra situado en el cromosoma 31 canino y en el locus 21q22.2 en el genoma humano, región denominada síndrome de Down región cromosómica 1 o DCR-1 ya que forma parte de la trisomía del cromosoma 21 en el Síndrome de Down y está asociada a varios caracteres que aparecen en el síndrome de Down como defectos craneofaciales y musculares (Debalar *et al.*, 1993).

Se encontró menor expresión de esta banda en el CI mediante los ensayos realizados con PCR a tiempo real ( $p=0,04$ ).

### 1.2.9 Banda 19

La banda 19 representaba la secuencia parcial del gen ATP6, también denominado ATP sintasa 6. La proteína ATP sintasa interviene en la formación de ATP.

No se obtuvieron resultados significativos en el análisis de expresión realizado mediante PCR a tiempo real ( $p=0,28$ ). Los resultados mostraban inhibición en la expresión de esta banda en tejidos CI.

### 1.2.10 Banda 23

La secuencia de la banda 23 se ha identificado dentro del gen SF3B1 que codifica la subunidad 1 del factor de splicing 3b.

No se encontró una expresión diferencial de esta banda en los ensayos realizados mediante PCR a tiempo real ( $p=0,45$ ), ni en los realizados mediante *pools* de ARNm :

	Banda 23
Carcinoma Inflamatorio	1
Carcinomas no CI	2,27
Tejido sano	1,01

### 1.2.11 Banda 24

La banda 24 según las bases de datos consultadas se correspondía con la secuencia del gen HELTZ. Este gen es miembro de la superfamilia de las ARN helicasas que alteran la conformación del ARN desenrollando regiones de doble cadena.

Los resultados del análisis de expresión individual mediante PCR a tiempo real no confirmaron la existencia de expresión diferente entre los distintos grupos de tejidos ( $p=0,29$ ), pero los resultados del análisis de expresión por *pools* al igual que los del análisis individual mostraban inhibición en la expresión de esta banda en el CI y en carcinomas no CI:

	Banda 24
Carcinoma Inflamatorio	1
Carcinomas no CI	0,56
Tejido sano	271,22

### 1.2.12 Banda 25

La secuencia de la banda 25 se identificó dentro del complejo locus C9orf78 que codifica en el cromosoma 9 humano el marco de lectura abierto 78. Este locus parece que codifica distintas proteínas sin secuencias solapantes. Sin embargo no se pudo confirmar su expresión diferencial mediante la técnica de PCR a tiempo real ( $p=0,82$ ).

### 1.2.13 Banda 31

La secuencia de la banda 31 no se encontró en bases de datos formando parte de la secuencia codificante de ningún gen. Pero si se correspondía con parte de la secuencia del cromosoma 27 canino y compartía alguna homología con secuencias expresadas (EST) como: DN383129, DN317335, TC56094, TC63764 y DN428956.

En el estudio de expresión realizado con 4 *pools* diferentes dentro del mismo grupo de animales se encontró una expresión mayor de esta banda en los tumores distintos del CI y la inhibición de la expresión en el CI ( $p=0,006$ ). Pero esta significación estadística no pudo confirmarse en el análisis de expresión por individuos ( $p=0,53$ ).

#### 1.2.14 Banda 33

La secuencia de la banda 33 se correspondía con una secuencia expresada (EST) en la especie canina y con parte de la secuencia del cromosoma 28 canino.

No encontrando en el análisis de expresión realizado mediante PCR a tiempo real de forma individual expresión diferencial de la banda ( $p=0,40$ ), si se puede observar una tendencia a una mayor expresión en los carcinomas distintos del CI en los estudios por *pools*:

	Banda 33
Carcinoma Inflamatorio	1
Carcinomas no CI	9,18
Tejido sano	1,62

#### 1.2.15 Banda 37

La secuencia de la banda 37 se correspondía con la secuencia del gen CG32333-PA.

No se pudo confirmar su expresión diferencial mediante la técnica de PCR a tiempo real de forma individual ( $p=0,30$ ), a pesar de que en el análisis realizado mediante *pools* se puede observar la inhibición de la expresión en el tejido CI y carcinomas no CI:

	Banda 37
Carcinoma Inflamatorio	1
Carcinomas no CI	4,17
Tejido sano	10,42

Nº Banda	Gen	Función molecular	Proceso Biológico	Localización celular
<b>Banda 1</b>	OLFML2B?	actividad del receptor de latrotoxina?	Desconocido	Citoplasma, extracelular y membrana plasmática
<b>Banda 5-6</b>	Secuencias expresadas: AJ537186, DN422622, DN752171 y DN376901	Desconocida	Desconocido	Desconocida
<b>Banda 7</b>	Proteína hipotética KIAA00355	Desconocida	Desconocido	Desconocida
<b>Banda 8-14</b>	Proteína latente 1 asociada a TGFbeta, TGF-beta1-BP-1	Actividad receptora de TGF beta, asociación de TGF y de iones de calcio	Ruta metabólica del factor de TGFbeta	Matriz extracelular
<b>Banda 9</b>	Proteína 14 PHD,PHF14	Unión de ADN	Regulación de la transcripción, ADN dependiente	Citoplasma y matriz extracelular
<b>Banda 11</b>	Caveolín-1,CAV1	Unión de subunidades de Integrinas a la tirosina quinasa FYN	Progresión del ciclo celular y acoplamiento de integrinas a la ruta Ras-ERK	Membranas caveolares e integrando la membrana plasmática
<b>Banda 16</b>	Gen CG11164	Desconocida	Desconocido	Desconocida
<b>Banda 18</b>	Dominio repetido tetratricopéptido, TTC3	Actividad ligasa ubiquitina-proteínas y unión de iones de Zn	Ubiquitinización de proteínas	Complejo de ligamiento de ubiquitina
<b>Banda 19</b>	ATP sintetasa F0 subunidad 6, ATP6	Sintetasa de ATP	Síntesis de ATP	ADN Mitocondrial
<b>Banda 23</b>	Gen SF3B1, codifica la subunidad 1 del factor de splicing 3b	Factor de splicing, unión a la cromatina.	Splicing nuclear del ARNm vía espliceosoma	Espliceosoma, citoplasma, membrana y núcleo
<b>Banda 24</b>	Gen HELTZ	Actividad helicasa e hidrolasa	Replicación del ADN	Núcleo y mitocondrias
<b>Banda 25</b>	complejo locus C9orf78	Desconocida	Desconocido	Desconocida
<b>Banda 31</b>	Secuencias expresadas: DN383129, DN317335, TC56094, TC63764 y DN428956.	Desconocida	Desconocido	Desconocida
<b>Banda 33</b>	Secuencia expresada: DN409026	Desconocida	Desconocido	Desconocida
<b>Banda 37</b>	gen CG32333-PA	Desconocida	Desconocido	Desconocida

**Tabla VIII.1.3.** Bandas obtenidas mediante la técnica de Differential Display: gen al que corresponden, función molecular, proceso biológico en el que participan y localización celular.



## 2 GENES CANDIDATOS

También se empleó la técnica de PCR a tiempo real en el estudio de expresión diferencial de genes candidatos funcionales, ya que permitía estudiar genes, en un genoma ya conocido, cuya actividad asociada a un proceso tumoral había sido previamente descrita.

Al igual que en la validación de resultados de Differential Display esta técnica comenzó realizándose procesando las muestras o individuos por separado, aunque después de los primeros experimentos se optó por analizar *pools* de los distintos grupos de muestras en primera instancia, que permiten extraer conclusiones más rápidas sobre la expresión en los diferentes tipos de muestras analizadas.

Como genes candidatos se seleccionaron aquellos genes previamente relacionados con cánceres mamarios o implicados en rutas metabólicas importantes en el desarrollo del cáncer de mama tanto en la especie humana como canina.

### 2.1 Genes implicados en rutas hormonales

No están claros los mecanismos de actuación hormonal sobre la etiología y desarrollo del cáncer mamario, sin embargo si se sabe que en la glándula mamaria los estrógenos y andrógenos modulan el crecimiento y diferenciación de las células mamarias (Liao *et al.*, 2002; Virrey *et al.*, 1998). Además distintos hallazgos concuerdan con la idea de que una alteración en el mecanismo normal de expresión de los receptores de estrógenos y de andrógenos podría producir un progresivo desarrollo tumoral, como el hecho de que los tumores que no presentan receptores de estrógenos  $\alpha$  son los más agresivos e indiferenciados (Mc Guire *et al.*, 1980; Nerurkar *et al.*, 1987; Rooney *et al.*, 1993).

Algunos estudios previos de CI canino relativos a secreción y regulación de diferentes hormonas tanto en suero como en el propio tejido mamario, indican que existe un mecanismo endocrino especial en el desarrollo del CI canino (Illera *et al.*, 2003; Peña *et al.*, 2003). Así se seleccionaron genes implicados en las rutas metabólicas de formación y metabolismo de andrógenos y estrógenos.

#### 2.1.1 *Receptores de estrógenos*

Los genes ESR1 o receptor de estrógenos  $\alpha$  y ESR2 o receptor de estrógenos  $\beta$  codifican los receptores de estrógenos que pertenecen a una superfamilia de receptores nucleares con función de factores de transcripción.

Cuando estudiamos la expresión de ESR1 en el CI mediante técnicas de PCR a tiempo real no encontramos resultados concluyentes ya que la imagen de la curva de disociación o “melting” no era válida. Así la amplificación del fragmento esperado no fue satisfactoria aunque se intentó medir la expresión diseñando varios cebadores para este gen, con los mismos resultados para todos ellos.

Se cuantificó la expresión del receptor de estrógenos  $\beta$ , a partir de muestras individuales, para los distintos dominios: dominio N-terminal con actividad en la regulación de la transcripción, dominio de unión al ADN y dominio de unión a estrógenos o de unión a hormonas. No se obtuvieron datos significativos en la expresión diferencial:

	Dominio N-terminal	Dominio de unión al ADN	Dominio de unión hormonal
P valor	0,25	0,37	0,36

### 2.1.2 Receptor de andrógenos

El receptor de andrógenos una vez activado gracias a la unión con la hormona se disocia en proteínas accesorias, migra hacia el núcleo y genera una estructura dimerizada, estimulando la transcripción de los genes de respuesta a andrógenos.

RA presenta diferencias de expresión entre los distintos tejidos estudiados: encontrando menor expresión en el CI. Se cuantificó la expresión del RA a partir de muestras individuales para sus distintos dominios: dominio N-terminal con actividad en la regulación de la transcripción, dominio de unión al ADN y dominio de unión a andrógenos o de unión a hormonas. Se obtuvieron datos significativos en la expresión de todos los dominios:

	Dominio N-terminal	Dominio de unión al ADN	Dominio de unión hormonal
P valor	0,01	0,0002	0,005

### 2.1.3 Aromatasa

El complejo enzimático citocromo p450 aromatasa actúa como paso limitante en la producción de estrógenos, catalizando la conversión de andrógenos en estrógenos.

La expresión del gen que codifica para la enzima aromatasa no parece diferenciarse entre los grupos de animales ( $p=0,55$ ), a pesar de existir una tendencia de sobre-expresión para este gen en el CI y en los carcinomas no CI (CI=11,54; Carcinomas no CI: 11,33; Tejido mamario sano: 9).

### 2.1.4 STS

La sulfatasa esteroidea cataliza la conversión de sulfato de estrona a estrona, y de  $17\beta$  sulfato de estradiol en  $17\beta$ -estradiol, es decir la conversión de estrógenos sulfatados en sus formas activas.

Se encontró la inhibición de la expresión del gen que codifica para la sulfatasa esteroidea en el CI dentro de los distintos fenotipos ( $p=0,01$ ).

### 2.1.5 EST

Este gen, también denominado SULT1E1, codifica una sulfotransferasa que cataliza la sulfatación de estrona y  $17\beta$ -estradiol, lo que podría controlar los niveles de los receptores estrogénicos.

Los niveles de expresión más altos los encontramos de forma significativa en los carcinomas distintos del carcinoma inflamatorio ( $p=0,02$ ).

### 2.1.6 17HSD1 y 17HSD2

Las enzimas  $17\beta$  hidroxisteroide-deshidrogenasas están implicadas en la regulación de esteroides. La enzima 17HSD tipo 1 cataliza la conversión de estrona en estradiol, mientras que la enzima 17HSD tipo 2 cataliza la oxidación de estradiol a estrona.

En los resultados obtenidos mediante *pools* de ARNm correspondientes a los distintos grupos de animales después de su normalización y estandarización en la aplicación de Microsoft Excel qBase Analyzer, no parecen observarse diferencias de expresión:

	17HSD1	17HSD2
Carcinoma inflamatorio	1,05	1
Carcinomas no CI	2,19	2,29
Tejido mamario sano	1	1

### 2.1.7 SULT1A1

La familia de enzimas denominadas sulfotransferasas (SULTs) catalizan la reacción de transferencia del grupo electrofílico sulfonato  $\text{SO}_2\text{3}$ , desde el cosustrato 30-fosfoadenisina 50-fosfosulfato (PAPS) al sustrato nucleofílico aceptor (Meloche *et al.*, 2001). En general las enzimas



SULT1 son responsables de la sulfatación de pequeños sustratos fenólicos como el p-nitrofenol (PNP), a-naftol, acetaminofén y dopamina (Tsoi *et al.*, 2001).

Se encontró mediante PCR a tiempo real menor expresión de SULT1A1 en las muestras tumorales, fundamentalmente en las correspondientes al CI ( $p=0,02$ ).

### **2.1.8 Receptor de progesterona**

El gen del receptor de progesterona, miembro de una superfamilia de receptores esteroideos, media la acción de la progesterona.

Para este gen se ha encontrado una “tendencia sugestiva” hacia la menor expresión en tumores mamarios caninos, tanto carcinomas distintos al CI, como en el CI frente a tejidos mamarios sanos, aunque sin significación estadística ( $p=0,07$ ).

## **2.2 Angiogénesis**

La proliferación de vasos de neoformación es un proceso necesario para el crecimiento tumoral. Los nuevos grupos de células neoformadas necesitan el aporte vascular para continuar su crecimiento (Casciato *et al.*, 2001). Una de las características del carcinoma inflamatorio es su gran capacidad angiogénica (Jaiyesimi *et al.*, 1992).

Varias moléculas son necesarias para promover la angiogénesis en tejidos normales, entre ellas seleccionamos algunos genes de relevancia.

### **2.2.1 Factor de crecimiento vascular-endotelial**

En tejidos sanos la molécula que principalmente controla la morfogénesis de los vasos sanguíneos es el factor de crecimiento vascular-endotelial (VEGF-A). VEGF-A forma parte de una familia de reguladores angiogénicos que incluye al factor de crecimiento de placenta (PIGF), VEGF-B, VEGF-C y VEGF-D (Shibuya *et al.*, 2006, Ferrara *et al.*, 2003). VEGF-C y VEGF-D son importantes reguladores de la linfangiogénesis (Karkkainen *et al.*, 2004, Baldwin *et al.*, 2005). VEGFR2 y VEGFR3 actúan como receptores de los factores de crecimiento vascular endotelial.

En los análisis de expresión realizados mediante *pools* los resultados para estos genes fueron los siguientes:

	VEGF-B	VEGF-C	VEGF-D	VEGFR2
Carcinoma inflamatorio	1	1	31,98	1
Carcinomas no CI	3,14	1,40	1	1,35
Tejido mamario sano	7,19	1,28	3,28	15,50

Con respecto a los resultados obtenidos en el estudio de las muestras individualizadas encontramos una expresión para el gen VEGF-A significativamente mayor en los carcinomas distintos al carcinoma inflamatorio ( $p=0,02$ ).

Para el gen VEGF-D también se encontraron diferencias de expresión significativas pero a diferencia de los resultados encontrados mediante *pools* se encontró una menor expresión en las muestras de tejido CI y carcinomas no CI. Para este gen fueron diseñados cebadores en dos regiones diferentes del mismo, observando resultados significativos en ambos casos:  $p=0,02$  y  $p=0,008$ .

En el análisis de VEGFR2 los resultados mostraban la inhibición de la expresión en el CI, pero sin significación estadística ( $p=0,19$ ). Sin embargo para VEGFR3 si se encontró significación estadística, con una menor expresión del gen en el tejido CI ( $p=0,01$ ).

En los genes VEGF-B ( $p=0,20$ ) y VEGF-C ( $p=0,34$ ) no se encontraron diferencias significativas de expresión entre los distintos tejidos.

### 2.2.2 Angiopoietina 1 y Angiopoietina 2

Las angiopoietinas son proteínas con importantes funciones en el desarrollo vascular y el proceso angiogénico. Todas las angiopoietinas se unen con la misma afinidad al receptor de células endoteliales con actividad proteína quinasa específica (TIE2). Originalmente TIE2 fue descrito como el segundo miembro de la subfamilia RTK con expresión predominante en el endotelio embriológico (Dumont *et al.*, 1992, Iwama *et al.*, 1993, Maisonpierre *et al.*, 1993). TIE1 y TIE2 comparten los mismos dominios con un dominio N-terminal de unión al ligando, un dominio transmembrana y un dominio tirosina quinasa. Se ha visto que TIE2 está altamente conservado entre las especies de mamíferos, lo que predice la importancia de su función biológica (Lyons *et al.*, 1998). Los resultados obtenidos del estudio de expresión en *pools* fueron los siguientes:

	ANGPT1	ANGPT2	TIE2
Carcinoma inflamatorio	1	1	2,60
Carcinomas no CI	4,32	1,10	1
Tejido mamario sano	11,42	1,98	5,44

No se midió la expresión relativa de forma individual en el gen ANGPT2 debido a los resultados obtenidos mediante *pools*.

La expresión de ANGPT1 no fue significativamente diferente entre los distintos grupos en el análisis de los individuos por separado ( $p=0,61$ ). Sin embargo para el gen TIE2 si se encontraron diferencias significativas ( $p=0,03$ ) que mostraban la inhibición de este gen en los tejido tumorales, fundamentalmente en los carcinomas no CI.

### 2.2.3 CD34

CD34 es un antígeno de superficie celular selectivamente expresado en células progenitoras hematopoyéticas. Participa en rutas metabólicas de adhesión celular, linaje de células hematopoyéticas y señalización de IL 17.

Se encontró mediante PCR a tiempo real menor expresión de CD34 en las muestras de carcinomas no CI, y fundamentalmente en el CI ( $p=0,05$ ).

### 2.2.4 LYVE-1

Este gen también denominado XLKD1 ha sido asociado previamente al cáncer de mama. Codifica la proteína integral de membrana tipo 1 con actividad transportadora del ácido hialurónico. LIVE-1 es un receptor abundante en los vasos linfáticos de la especie humana y murina (Banerji *et al.*, 1999, Prevo *et al.*, 2001) y se suele emplear como marcador para la detección y caracterización de vasos linfáticos en las distintas neoplasias (Jackson *et al.*, 2003).

Los resultados del análisis realizados por *pools* de muestras son los siguientes:

	LIVE-1
Carcinoma Inflamatorio	1
Carcinomas no CI	2,79
Tejido sano	3,26

Al igual que en los resultados obtenidos en el análisis de los *pools*, la mayor expresión del gen LIVE-1 se encontró en el análisis de las muestras individuales de tejido mamario sano, a continuación en los carcinomas distintos del carcinoma inflamatorio, mostrando las muestras CI una inhibición de su expresión, no obstante los resultados no fueron significativos ( $p=0,18$ ).

### **2.2.5 Factor de Von Willebrand**

La glicoproteína codificada por el gen VWF funciona como portador del factor antihemofílico y como mediador en el sistema de coagulación sanguíneo. El factor von Willebrand se sintetiza principalmente por las células endoteliales (Ruggeri *et al.*, 1991, Girma *et al.*, 1987) y juega un papel esencial en el proceso de hemostasis, mediando la adhesión de las plaquetas a las superficies subendoteliales donde se ha producido la lesión vascular y actuando como proteína portadora del factor VIII (Handin *et al.*, 1989).

Los datos del estudio de expresión diferencial obtenidos mediante el análisis de varianza de 4 *pools* para cada uno de los grupos, arrojan diferencias de expresión entre los distintos fenotipos ( $p=0,02$ ), siendo los carcinomas no CI el grupo con menor expresión, aunque también encontramos inhibición en la expresión en tejidos CI. Sin embargo aunque en el estudio de muestras individualizadas se mantiene la menor expresión de VWF en carcinomas no CI y CI, baja la significación estadística ( $p=0,09$ ), manteniendo una tendencia sugestiva.

## **2.3 Adhesión celular y transducción de señales**

Las moléculas de adhesión celular son proteínas complejas que se localizan en la membrana de la célula tumoral y realizan funciones de relación con otras células y con la matriz extracelular. Juegan un papel fundamental en determinados procesos biológicos pero también en procesos de invasión.

### **2.3.1 PECAM**

Este gen participa en varias rutas metabólicas como la adhesión de moléculas celulares (CAMs), migración transendotelial leucocitaria, y en distintos procesos como la movilidad celular o la transducción de señales de la proteína Rho. También ha sido asociado con distintas patologías como la arterioesclerosis o el cáncer de mama y se ha utilizado marcaje de moléculas de adhesión fundamentales en angiogénesis, como PECAM, para el estudio de la angiogénesis intratumoral y correlacionarlo con el pronóstico (Fox *et al.*, 1995).

Sin embargo no se encontró una expresión significativamente diferente de este gen comparando entre individuos con carcinoma inflamatorio, carcinomas no CI y tejido mamario sano ( $p=0,26$ ), aunque sí se observara la tendencia a estar inhibida su expresión en el tejido CI.

### **2.3.2 ESAM**

ESAM participa en rutas de adhesión celular y en procesos de adhesión de células hemofílicas. La proteína posee funciones de unión proteica y se localiza en la membrana celular, mitocondrias, núcleo y en uniones adherentes y estrechas. La proteína codificada por este gen, llamada molécula de adhesión endotelial célula-selectiva (ESAM), es una glicoproteína transmembrana tipo I con dominios inmunoglobulina tipo V y C2.

Los resultados del análisis de los individuos mostraban inhibición en la expresión del gen en el tejido CI, sin embargo las diferencias no fueron significativas ( $p=0,24$ ).

### **2.3.3 THBS1**

La proteína trombospondina codificada por este gen es una subunidad de una glicoproteína que media interacciones intercelulares y de la células con la matriz extracelular. Esta proteína juega papeles importantes en transporte de membrana y transducción de señales además de participar en la agregación plaquetaria, angiogénesis y tumorigénesis. La trombospondina (TSP-1) fue el primer inhibidor de la angiogénesis identificado. Es una glicoproteína trimérica de 420 kDa que pertenece a una familia de proteínas que incluye también a TSP-2, TSP-3, TSP-4, y TSP-5. TPS-1 está presente en la matriz extracelular de la mayoría de tejidos normales y es producida por gran variedad de células como macrófagos, fibroblastos, y células endoteliales.

En los carcinomas mamarios distintos del carcinoma inflamatorio THBS1 se expresaba más que en el resto de los grupos ( $p=0,05$ ). También en el CI encontramos sobre-expresión de THBS1 respecto al tejido mamario sano.

### **2.3.4 CD47**

El gen CD47 codifica una proteína de membrana denominada proteína integrina asociada o CD47 que actúa como receptor del dominio carboxilo terminal de TSPs (Gao *et al.*, 1996, Frazier *et al.*, 1999, Brown *et al.*, 2001). CD47 está involucrada en el incremento de la concentración de calcio intracelular que tiene lugar durante la adhesión celular de la matriz extracelular, además participa en procesos de migración, agregación plaquetaria y proliferación

celular (Brown *et al.*, 2001), y fuera de las funciones asociadas con la señalización integrina, CD47 parece participar en otros aspectos de la regulación celular.

Los resultados del análisis de expresión en *pools* no muestran diferencias evidentes, por lo que no se ha procedido al análisis individual de las muestras:

	CD47
Carcinoma Inflamatorio	1
Carcinomas no CI	1,08
Tejido sano	1,03

### 2.3.5 Endoglina

La proteína endoglina es una proteína homodimérica transmembrana altamente expresada en células endoteliales, componente del complejo TGF beta.

No se observa expresión diferente de este gen entre los distintos grupos de muestras en los análisis de expresión realizados en *pools* ni en los realizados en las muestras individuales ( $p=0,94$ ):

	Endoglina
Carcinoma Inflamatorio	1,19
Carcinomas no CI	1
Tejido sano	2,34

### 2.3.6 FN1

La glicoproteína fibronectina está codificada por el gen fibronectina 1 (FN1). La fibronectina es una glicoproteína de la matriz extracelular que contiene distintos sitios de unión para moléculas de la matriz, incluyendo el colágeno, heparina, fibrina, receptores integrinas, ADN y bacterias (Hynes *et al.*, 1992). Gracias a estas interacciones la fibronectina realiza muchas funciones biológicas como el mantenimiento de la integridad de la matriz extracelular, uniones celulares, proliferación, migración y control de la morfología celular y de la diferenciación.

Los resultados del análisis realizado en *pools* muestran una expresión normal en CI a pesar de estar inhibido en tumores no CI:

	FN1
Carcinoma Inflamatorio	3,53
Carcinomas no CI	1
Tejido sano	4,21

### 2.3.7 CDH5

Denominado cadherina 5 pertenece a una superfamilia localizada en la región del brazo largo del cromosoma 16 que está implicada en la pérdida de heterocigosis en cánceres mamarios y de próstata. La proteína codificada por este gen es una glicoproteína de adhesión intercelular calcio dependiente, compuesta por 5 repeticiones cadherina extracelulares, una región transmembrana y un tallo citoplasmático altamente conservado. Cadherina 5 proporciona a las células la capacidad de adherirse de forma homofílica, y también participa en la cohesión y organización de las uniones intercelulares endoteliales.

CDH5 se expresa de forma similar en los distintos tejidos estudiados ( $p=0,96$ ). El análisis de expresión se realizó mediante 4 *pools* para cada uno de los grupos de animales.

## 2.4 Invasión y metástasis

A pesar de los avances en el diagnóstico temprano, técnicas quirúrgicas, terapias adyuvantes o neoadyuvantes, la mayoría de los pacientes mueren como resultado de las metástasis, las cuales son resistentes a las terapias convencionales (Fidler *et al.*, 1978). La capacidad de invasión de los tumores les permite penetrar en el interior de los vasos sanguíneos, linfáticos y cavidades corporales, lo que les permite diseminarse. El carcinoma inflamatorio está caracterizado por su rápida progresión y gran capacidad invasiva (Jaiyesimi *et al.*, 1992).

### 2.4.1 Metaloproteínasa de matriz 2

Las proteínas de la familia de las metaloproteinasas de matriz están involucradas en procesos fisiológicos de degradación de la matriz extracelular, como en el desarrollo embriológico, en procesos reproductivos, y en remodelación tisular, y en procesos patológicos como artritis y metástasis. La metaloproteínasa de matriz 2 (MMP2) degrada el colágeno de tipo IV que es el componente mayoritario de la membrana basal.

En el análisis de expresión realizado entre los distintos fenotipos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,16$ ), aunque parece que este gen está inhibido en el caso del CI (CI=9,40; carcinomas no CI= 10,83; Tejido mamario sano=15,66).

## **2.5 Genes relacionados con la ruta del ácido araquidónico**

Las enzimas ciclooxigenasas COX-1 y COX-2 catalizan la formación de prostaglandinas a partir de ácido araquidónico, desempeñando un papel importante en distintos procesos fisiológicos y patológicos entre ellos en el cáncer, por eso fueron seleccionados como genes candidatos funcionales.

### **2.5.1 COX-1**

No se encontró una expresión diferencial de la ciclooxigenasa 1 o prostaglandina-endoperoxidase sintetase 1 en los ensayos realizados mediante PCR a tiempo real de las distintas muestras ( $p=0,95$ ).

### **2.5.2 COX-2**

En los resultados obtenidos del análisis de expresión realizado mediante PCR a tiempo real de forma individual se obtuvo una sobre-expresión clara de la ciclooxigenasa 2 en el carcinoma inflamatorio ( $p=0,004$ ), lo que demuestra que su actividad está claramente relacionada con la progresión de los CI.

## **2.6 Factores de transcripción**

### **2.6.1 FOS**

La familia FOS está formada por cuatro genes: FOS, FOSB, FOSL1 y FOSL2. Estos genes codifican proteínas que generan dímeros junto con proteínas de la familia JUN formando el factor de transcripción AP-1. Las proteínas FOS han sido implicadas en regulación de la proliferación celular, diferenciación y transformación.

En los resultados que se obtuvieron del análisis de *pools* se observa sobre-expresión del gen FOS en tumores no CI, sin embargo no parece mostrarse esta sobre-expresión en el CI:



	FOS
Carcinoma Inflamatorio	1,23
Carcinomas no CI	5,38
Tejido sano	1

### 2.6.2 JUN

El gen JUN codifica una proteína similar a la proteína viral del sarcoma aviar e interactúa con secuencias diana específicas en el ADN regulando la expresión génica.

No parece existir expresión diferencial de JUN en los análisis de expresión realizados en *pooles*:

	JUN
Carcinoma Inflamatorio	1
Carcinomas no CI	1,58
Tejido sano	2,26

### 2.6.3 PIK3R1

La proteína fosfatidilinositol 3-quinasa (PI 3-quinasa) es un heterodímero compuesto por dos subunidades: una subunidad reguladora de 85 kDa (p85) y una subunidad catalítica de 110 kDa (p110) (Shepherd *et al.*, 1998).

El gen fosfatidilinositol 3-quinasa participa en procesos de apoptosis celular, ruta metabólica del receptor de células B, ruta del factor de crecimiento epitelial, y acciones metabólicas de la insulina. Además ha sido asociado al desarrollo de varias patologías como el cáncer de mama.

Los resultados del análisis de expresión en *pooles* no muestran diferencias evidentes para el CI:

	PIK3R1
Carcinoma Inflamatorio	1,01
Carcinomas no CI	2,20
Tejido sano	1

### 2.6.4 MYC

La proteína codificada por MYC es una fosfoproteína nuclear con actividades en la progresión del ciclo celular, apoptosis y transformación celular. MYC regula la transcripción de determinados genes. Se sabe que este gen tiene un papel clave en el control del ciclo celular activando la proliferación e inhibiendo la diferenciación. Regula positivamente los complejos ciclina-CDK que actúan en la fase G1 del ciclo celular (Caelles, 2000).

No se ha encontrado una mayor expresión de este gen para ninguno de los grupos de muestras ( $p=0,37$ ).

## 2.7 Genes asociados con cáncer de mama

En los últimos años se han identificado diversos genes de susceptibilidad a desarrollar cáncer de mama. Entre ellos los que seleccionamos como genes candidatos.

### 2.7.1 *erbB-2*

Este gen codifica un miembro de la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico. Dentro de los genes codificantes para factores del crecimiento se han estudiado, relativos al cáncer mamario, los oncogenes *erbB* que es análogo del receptor para el factor de crecimiento epidérmico, y *neu/erbB-2/HER-2/neu* de la familia del receptor para el factor de crecimiento epidérmico. La amplificación y/o sobre-expresión de este gen ha sido documentada en numerosas neoplasias, entre ellas las de mama y ovarios.

El análisis de expresión realizado en los *pools* se muestra a continuación:

	<i>erbB-2</i>
Carcinoma Inflamatorio	1
Carcinomas no CI	4,87
Tejido sano	7,43

Los resultados del análisis realizado con las muestras individualizadas muestran también la inhibición en la expresión del gen *erbB-2* en el CI ( $p=0,04$ ).

### 2.7.2 **WISP3**

La proteína codificada por WISP3 pertenece a la subfamilia WISP dentro de la familia del factor de crecimiento del tejido conectivo (TCGF). El gen LIBC/WIPS3 está localizado en la región Hsa 6q22-q23 (región con frecuentes deleciones en tumores mamarios). Pertenece a la familia IGFBP que está implicada en la progresión cancerígena regulando el crecimiento celular, la invasión y angiogénesis (van Golen *et al.*, 1999), además este gen parece que funciona como gen supresor de tumores en el tejido mamario y su pérdida de función contribuye al fenotipo proliferativo e invasivo (Kleer *et al.*, 2002). Se ha encontrado sobre-expresión de este gen en cánceres de colon y carcinomas inflamatorios humanos. Además mutaciones en WISP3 se han asociado a diferentes patologías como la displasia pseudoreumatoide progresiva.

El análisis de expresión no arroja resultados significativos ni para el estudio de *pools* ( $p=0,42$ ), ni para el de los animales por separado ( $p=0,35$ ).

### 2.7.3 **CDKN1A**

El gen inhibidor de las ciclinas dependientes de kinasas codifica un inhibidor de la actividad de los complejos ciclin-CDK2 y/o ciclin-CDK4 regulando la progresión del ciclo celular en la fase G1.

En el estudio de expresión realizado de CDKN1A con 4 *pools* diferentes dentro del mismo grupo de animales no se encontró una expresión diferencial entre los distintos tipos de muestras ( $p=0,88$ ).

## ***IX. DISCUSIÓN***



## ***IX. DISCUSIÓN***

### **1 GENES OBTENIDOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE DIFFERENTIAL DISPLAY**

#### **1.1 Bandas Differential Display**

Las diferencias de expresión encontradas entre los distintos grupos de muestras para las bandas obtenidas mediante la técnica de Differential Display se confirmaron mediante la técnica de PCR a tiempo real. En algunos casos los datos obtenidos mediante PCR a tiempo real sugerían distinta expresión entre los fenotipos (la media para cada grupo de muestras ofrecía diferencias evidentes), y sin embargo no generaban diferencias significativas.

Cuando se comenzó estudiar la expresión del CI se eligió la técnica de Differential Display porque en conjunto cumplía una serie de requisitos que consideramos necesarios, como el bajo requerimiento de ARN de partida, la capacidad de detección de gran cantidad de genes no asociados previamente al cáncer mamario ni concretamente al CI, y fundamentalmente porque es un sistema abierto, ya que en el año 2003 todavía no se había publicado la secuencia completa del genoma canino. Por ello aunque no se hayan confirmado algunos de los resultados obtenidos mediante esta técnica, los genes encontrados con diferencias claras en su expresión aportan nuevas rutas metabólicas a tener en cuenta en el desarrollo del CI.

Los resultados obtenidos se han clasificado en función de los resultados obtenidos en los análisis de expresión de la siguiente manera:

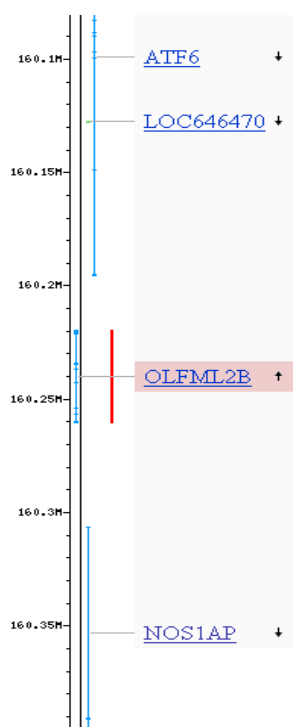
- ✓ Primero aquellas bandas cuya expresión diferente fue confirmada mediante PCR a tiempo real.
- ✓ A continuación los resultados de expresión diferente entre los grupos de muestras no confirmados estadísticamente.
- ✓ Por último otros resultados.

##### **1.1.1 Banda 1**

La secuencia que hemos llamado banda 1, encontrada mediante la técnica de Differential Display y estudiada mediante PCR a tiempo real, mostraba una mayor expresión en el CI ( $p=0,05$ ).

No se encontró en bases de datos caninas ningún gen que se correspondiera con su secuencia, pero sí con parte de la secuencia del cromosoma 38 canino.

En la especie humana esta banda fue situada dentro de la región del cromosoma 1 (Hsa 1q23.3) donde se ubica el gen denominado Olfactomedin-like 2B (OLFML2B). La función *in vivo* del gen OLFML2B es hasta el momento desconocida, no habiéndose asignado al gen ningún fenotipo en particular, aunque si se han descrito 4 variantes de splicing del ARNm y se piensa que las proteínas pueden tener función molecular, actividad del receptor de latrotoxina, y se localizarían en varios compartimentos (citoplasma, extracelular y membrana). La secuencia de la banda 1, sin embargo, no se localiza en la región codificante de este gen. En el genoma canino, aunque más alejados de la secuencia correspondiente con la banda 1 y en el otro sentido, podemos encontrar los genes ATF6 o factor de transcripción activante 6, y NOS1AP o proteína adaptadora (neuronal) de la oxido nítrico sintetasa 1 (Figura IX.1.1).



**Figura IX.1.1.** Región cromosómica Hsa 1q23.3 que incluye a la banda 1.

En la base de datos TIGR se encontró homología, aunque escasa, de la banda 1 con el factor de transcripción murino COE-3 o factor temprano de células B3.

Para obtener más información y buscando posibles mutaciones causantes de la diferencia de expresión observada en la banda 1, se compararon las secuencias correspondientes con banda 1 de las distintas muestras del estudio, y se observó en algunos individuos una delección de 9 nucleótidos en su secuencia. Esta delección no pudo ser asociada a ninguno de los grupos establecidos, pero todos los datos sobre esta secuencia sugieren la realización de más estudios que esclarezcan este interesante hallazgo.

### 1.1.2 Bandas 9 y 18 (PHF14 y Tetratricopéptido TTC3)

En los análisis de expresión realizados mediante la técnica de PCR a tiempo real se encontró inhibida la expresión de PHF14 ( $p=0,04$ ) y TTC3 ( $p=0,04$ ) en el tejido CI.

El locus PHF14 codifica la proteína denominada PHD proteína 14, que parece participar en procesos de regulación de la transcripción ADN independientes e interacciones proteicas, como el proceso de ubiquitinización y ensamblaje de complejos proteicos (Matthews *et al.*, 2002).

La proteína codificada por el gen TTC3 contiene el motivo tetratricopéptido (TPR) (Figura IX.1.3) encontrado en proteínas involucradas en la regulación de la síntesis de ARN y en procesos de mitosis (Goebel *et al.*, 1991; Lamb *et al.*, 1995). TPR también media procesos de interacción entre proteínas y ensamblaje de complejos proteicos (Groves *et al.*, 1999).

El motivo TPR está formado por 316 repeticiones en tandem de 34 residuos aminoacídicos, aunque pueden encontrarse motivos TPR individuales dispersos por la secuencia de la proteína. Este dominio ha sido identificado en diferentes organismos, desde bacterias al hombre, y en diferentes localizaciones subcelulares como el núcleo, el citoplasma celular o las mitocondrias. Las proteínas que contienen el motivo TPR están implicadas en gran variedad de procesos como la regulación del ciclo celular, control transcripcional, inhibición de las proteínas quinasas, transporte mitocondrial y peroxisomal, neurogénesis y plegamiento de proteínas (Goebel *et al.*, 1991). Sin embargo se desconoce en que proceso biológico participa la proteína codificada por TTC3 y la localización celular o extracelular de la misma, pudiendo formar parte de un complejo macromolecular situado en distintas localizaciones dentro de la célula.

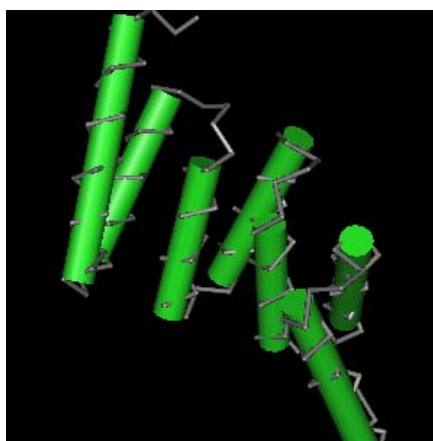


Figura IX.1.2. Dominio TPR

TTC3 también contiene el dominio denominado zinc-finger RING-type. RING-finger es un tipo especial de Zinc-finger formado por 40-60 residuos unidos a dos átomos de zinc. El dominio RING es un dominio de interacción proteico que media gran variedad de procesos



biológicos, entre ellos la actividad de la proteína ligasa ubiquitina E3 que es intrínseca al dominio RING. Las proteínas ligasas ubiquitinas (E3s) determinan el sustrato específico que será marcado para su posterior degradación dentro del sistema ubiquitina-proteosoma.

El sistema ubiquitina-proteosoma media la degradación de proteínas. Este proceso se conoce como proteólisis. Varias moléculas de ubiquitina se anclan a la proteína a eliminar y esta se mueve hacia el proteosoma, estructura donde se lleva a cabo el proceso de la proteólisis. La ubiquitina puede marcar incluso proteínas de la membrana celular, por ejemplo receptores, para que sean eliminadas de la membrana.

En el caso de que los productos de los genes PHF14 y TTC3 interviniesen en procesos de ubiquitinización de proteínas nuestros resultados soportarían la hipótesis de un mejor funcionamiento del proceso de proteólisis en el tejido sano, ya que en el CI, por la menor expresión de PHD14 y TTC3, disminuiría la degradación de proteínas mediada por el sistema ubiquitina-proteosoma.

### **1.1.3 Banda 11 (CAV1)**

La secuencia de la banda 11 se ha localizado en la región cromosómica Hsa 7q31.1 y Cfa 14. En esta región se encuentra el gen Caveolín 1 (CAV1). CAV1 se encuentra expresado en numerosos tipos celulares como fibroblastos, adipocitos, células musculares lisas, células endoteliales y células epiteliales (Razani *et al.*, 2001).

La proteína codificada por el gen CAV1 es el principal componente estructural de las caveolas (Glenney and Zokas, 1989; Rothberg *et al.*, 1992; Scherer *et al.*, 1996). Las caveolas se encuentran en la membrana plasmática y tiene actividades en el tráfico vesicular de proteínas y de colesterol, y la transducción de señales (Galbiati *et al.*, 2001). La proteína Caveolina 1 es una proteína integral de membrana con 21-24 kDa, descrita como el sustrato principal de v-Src tirosina quinasa en fibroblastos transformados por el virus del sarcoma de Rous, sugiriendo que caveolina 1 podría ser diana de modificaciones e inactivaciones llevadas a cabo por oncogenes activados (Glenney *et al.*, 1989).

Tanto caveolina 1 como las caveolas participan en la regulación de la homeostasis intracelular de lípidos. Caveolina 1 se asocia a gotas lipídicas, siendo un componente clave en el equilibrio de colesterol intracelular y en el transporte de lípidos en los fibroblastos (Pol *et al.*, 2001). Se ha sugerido que las carencias de caveolina 1 pueden estar asociadas a la acumulación de colesterol en el retículo endoplásmico (Frank *et al.*, 2006).

Además se ha visto que la proteína caveolina 1 une subunidades de integrina a la tirosina quinasa FYN, dentro de los pasos iniciales de la ruta Ras-ERK, promoviendo la progresión del

ciclo celular. CAV1 se ha propuesto como gen supresor de tumores y regulador negativo de la cascada Ras-p42/44 MAP quinasa (Engelman *et al.*, 1998).

Sager *et al.* fueron los primeros en sugerir el papel de CAV1 en el cáncer de mama. Utilizando técnicas de Differential Display y de hibridación identificaron 26 “genes candidatos supresores de tumores”, es decir genes cuyo ARNm se encontraba en menor cantidad en células derivadas de adenocarcinomas mamarios humanos (Sager *et al.*, 1994). De los 26 genes uno se correspondía con CAV1. Además observaron que la expresión de CAV1 se encontraba reducida o totalmente inhibida en varias líneas celulares epiteliales mamarias humanas transformadas (MT-1, MCF-7, ZR-75-1, T47D, MDAMB-361, yMDA-MB-474). Y, sin embargo, ARNm de CAV1 y la proteína caveolina 1 se expresaban abundantemente en células epiteliales mamarias humanas normales (Sager *et al.*, 1994; Engelman *et al.*, 1998; Engelman *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2001).

Existen otras evidencias que apoyan la idea de que el gen CAV1 funciona como supresor tumoral en la glándula mamaria. Lee *et al.* mostraron que la expresión recombinante de CAV1 en la línea celular derivada de cáncer mamario humano T-47D inducía una reducción del 50% de la proliferación celular (Lee *et al.*, 1998). También se ha demostrado que la expresión de CAV1 disminuye el potencial metastásico de la línea celular tumoral mamaria MTLn3 (Zhang *et al.*, 2000).

El locus donde se encuentra situado CAV1 dentro del genoma humano 7q31.1 es un “punto caliente” de deleciones en gran variedad de tumores de células epiteliales, incluidos tumores mamarios (Shridhar *et al.*, 1997; Jenkins *et al.*, 1998; Engelman *et al.*, 1998; Engelman *et al.*, 1999). Además CAV1 en esta región se localiza adyacente al marcador de pérdida de heterocigosis D7S522 (Engelman *et al.*, 1999).

En contra de estos estudios Van den Eyden *et al.* encontraron un aumento significativo en la expresión de caveolin 1, tanto en su ARNm como en la proteína, en tejidos CI humanos y líneas celulares derivadas de CI, comparados con muestras no CI. Encontraron CAV1 1,7 veces más expresado ( $p=0,02$ ), a pesar de que no todas las muestras lo expresan (41,4%) frente a los no CI (solo un 15,6% lo expresa). También observaron la hipometilación de la región promotora de CAV1 en la línea celular SUM149 derivada de CI humano (Van den Eynden *et al.*, 2006). Además se ha observado que tanto la pérdida como la sobre-expresión de CAV1 son marcadores de progresión en variedad de tumores. Y se ha sugerido el papel de CAV1 como promotor de procesos de migración celular y metástasis (van Golen *et al.*, 2006).

En nuestros análisis se observaba sobre-expresión de la banda 11 en el CI y en los carcinomas distintos del CI (CI=11,27; Carcinomas no CI=16,57; tejido mamario sano=8,83),

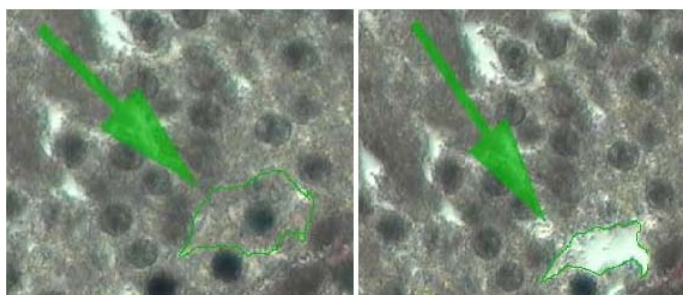
aunque las diferencias no sean estadísticamente significativas ( $p=0,13$ ) debido al rango de variación de la expresión de la secuencia correspondiente al gen dentro del grupo CI. Curiosamente, se ha observado que dentro de las muestras CI aquellas con mayor expresión de la banda 11 habían sido diagnosticadas histológicamente como carcinomas ricos en lípidos. El hecho de que una proporción de CI caninos han sido descritos histológicamente como carcinomas ricos en lípidos, ya que presentan una gran cantidad de gotas lipídicas (Peña *et al.*, 2003), junto con la observación de que carencias de caveolina 1 pueden estar asociadas a la acumulación de colesterol (Frank *et al.*, 2006), y que la mayor expresión de la banda la hayamos encontrado en los CI ricos en lípidos, nos hace pensar que CAV1 puede estar participando en la presentación de estas gotas lipídicas características de algunos CI caninos, mediando el tráfico vesicular de colesterol u otros lípidos, como distintas hormonas (Sánchez-Archidona *et al.*, 2007).

#### 1.1.4 Otras bandas

Dentro de los resultados obtenidos en el análisis realizado por PCR a tiempo real se encontraron datos que sugerían la expresión diferente entre los grupos de muestras pero sin significación estadística, además de otros datos que no confirmaban los resultados obtenidos mediante Differential Display. Esto podría deberse a los altos coeficientes de variación dentro del mismo grupo que observamos y que tratamos de paliar mediante la utilización de *pools*. Las variaciones de expresión para un gen en el tejido CI, que arrojan coeficientes de variación elevados podrían deberse a su vez a la heterogeneidad encontrada histológicamente en esta forma de presentación tumoral. El CI se diagnostica, como se ha comentado previamente, clínicamente basándose en la presentación de la sintomatología característica del CI o histopatológicamente mediante biopsia de la piel afectada que nos permite observar la invasión de los capilares linfáticos por parte del tumor (Brooks *et al.*, 1998; Meloni *et al.*, 1999). Sin embargo no existe un tipo histológico específico en el CI canino (Pérez-Alenza *et al.*, 2001). Además estudios realizados por Lerebours *et al.* en el CI humano subdividen distintas muestras de CI según la expresión de varios genes (VEGF-A, IL8, MYCN, SHH y EREG) que asocian a mejor o peor pronóstico (Lerebours *et al.*, 2003; Bieche *et al.*, 2004; Lerebours *et al.*, 2008). En nuestro estudio la clasificación de las muestras no tuvo en cuenta la variedad en cuanto a presentación primaria o secundaria, patrones histológicos distintos de invasión tumoral de la piel, diferentes diagnósticos histopatológicos o pronóstico, existentes dentro del CI. La razón de que las muestras de CI canino no se subdividieran fue el número reducido de muestras de que disponíamos (11 muestras de CI canino espontáneo) debido a su baja incidencia.

Además, salvo algunos procesos hematopoyéticos, linfoproliferativos y tumores infantiles de células pequeñas, no hay alteraciones moleculares específicas de un determinado tumor, es decir que existen pocos tumores con alteraciones constantes y/o patognomónicas. Dentro del gran número de alteraciones moleculares que pueden conllevar ventaja de crecimiento celular, los múltiples agentes carcinógenos (químicos, víricos y radiaciones) pueden activar indistintamente a varios genes, y lo que finalmente lleva al desarrollo tumoral es la acumulación complementaria de varias alteraciones oncogénicas que contrarresten los controles fisiológicos de proliferación celular y los diversos factores mesenquimales e inmunológicos (Ramón y Cajal, 2000).

Otro factor que podría estar influyendo en la heterogeneidad de las muestras, y por lo tanto en los altos coeficientes de variación, es la variedad de células (células epiteliales, conectivas...) que encontramos en las muestras de tejidos mamarios (sanos y tumorales) a partir de las cuales se realiza la extracción de ARN total. La utilización de técnicas de micro-disección con captura por láser permitiría recoger de la muestra solo aquellas células que se quisieran analizar (Figura IX.1.3).



**Figura IX.1.3.** Selección celular mediante la técnica de micro-disección por captura láser.

Pero esta técnica no pudo ser realizada debido al conservante en el cual se habían mantenido las muestras desde un principio, RNAlater (SIGMA), que impedía la realización de parte de la metodología previa de la técnica de de micro-disección con captura por láser.

Por lo tanto, las condiciones de análisis de las muestras no han sido seguramente las mejores y se está trabajando ahora mismo en desarrollar líneas celulares y un biomodelo del CI canino y humano que permitirán en un futuro próximo confirmar los genes que han aparecido con una expresión diferencial e identificar otros que son claves en el desarrollo de esta tumoración tan grave.



## 2 GENES CANDIDATOS

### 2.1 Genes implicados en rutas hormonales

La formación de hormonas sexuales en tejidos periféricos, como las glándulas mamarias, está bien documentada en la especie humana (Blankenstein *et al.*, 1999; Maggiolini *et al.*, 2001). La dependencia hormonal del cáncer mamario ha sido muy estudiada (Illera *et al.*, 2003), encontrando relación entre las secreciones hormonales de tejido mamario tumoral y sano, y el desarrollo de tumores mamarios (Vermeulen *et al.*, 1986; Blankenstein *et al.*, 1999; Maggiolini *et al.*, 2001; Liao *et al.*, 2002). Los mecanismos de actuación hormonal sobre la etiología y desarrollo del cáncer mamario no están claros, pero si se sabe que en la glándula mamaria los estrógenos y andrógenos modulan el crecimiento y diferenciación de las células mamarias (Birrell *et al.*, 1998; Liao *et al.*, 2002).

Estudios previos de CI canino relativos a secreción y regulación de diferentes hormonas tanto en suero como en el propio tejido mamario, indican que existe un mecanismo endocrino especial en el desarrollo del CI canino (Illera *et al.*, 2003; Peña *et al.*, 2003), además se han encontrado evidencias histopatológicas de la secreción de lípidos por las células del CI (Peña *et al.*, 2003). En estos estudios observaron cantidades hormonales mayores de androstenediona, dihidroepiandrosterona, testosterona, progesterona, sulfato de estrona y  $17\beta$ -estradiol en homogeneizados de tejido mamario CI, respecto a mamas normales, tumores benignos y tumores malignos no CI (Peña *et al.*, 2003; Illera *et al.*, 2003; Sánchez-Archidona *et al.*, 2007). Todos los niveles séricos de estas hormonas estudiadas están significativamente elevados en el CI, excepto el  $17\beta$ -estradiol que, a pesar de los altos niveles encontrados en el tejido tumoral del CI, se encuentran significativamente disminuidos (Peña *et al.*, 2003). Parece que una gran proporción de las hormonas esteroideas encontradas en el tejido mamario del CI han sido producidas *in situ* (Peña *et al.*, 2003) y ejercerán su función de manera autocrina o paracrina (Maggiolini *et al.*, 2001). Sin embargo, la actuación local del exceso estrogénico no parece estar mediada por el receptor de estrógenos  $\alpha$  (RE $\alpha$ ) ya que todos los CI analizados mediante técnicas inmunohistoquímicas fueron negativos a RE  $\alpha$  (Peña *et al.*, 2003), y su expresión medida mediante PCR a tiempo real no ofreció datos concluyentes de expresión (Sánchez-Archidona *et al.*, 2007). En nuestros estudios de expresión del gen del RE $\alpha$  no encontramos una amplificación clara.

Estudios previos han determinado, mediante técnicas de PCR a tiempo real, la sobreexpresión del RE  $\beta$  en tumores con pronóstico desfavorable, como aquellos que no responden al tratamiento con Tamoxifeno (Iwao *et al.*, 2000). Sin embargo otros estudios de detección de RE  $\beta$  con RT-PCR hablan de su menor expresión en tumores respecto a tejido mamario sano (Speirs *et*

*al.*, 1999). En nuestro caso no se ha encontrado expresión diferencial de RE  $\beta$  entre los distintos tejidos caninos analizados, es decir entre carcinomas inflamatorios, carcinomas no CI y tejido mamario sano.

En el caso de la progesterona, se han encontrado en la especie canina receptores para progesterona en el 50% de los tumores malignos y en el 70% de los tumores benignos y en el tejido glandular mamario normal (Corrada *et al.*, 2001), disminuyendo a medida que el tumor se maligniza. El CI humano posee un número menor de receptores de progesterona que otros tipos de cánceres de mama (De Larue *et al.*, 1981; Harvey *et al.*, 1982; Kokal *et al.*, 1985; Paradiso *et al.*, 1989; Koh *et al.*, 1990; Maloisel *et al.*, 1990). Incluso hay una menor expresión citosólica del receptor de estrógenos  $\alpha$  y de progesterona en el CI con respecto a otros tumores localmente avanzados (Paradiso *et al.*, 1989).

En carcinomas inflamatorios mamarios humanos metastáticos la proporción de casos positivos a la expresión inmunohistoquímica del RE  $\alpha$  es menor, encontrándose el receptor de progesterona más expresado que el receptor estrogénico (8,7% RE positivos y 17,4% RP positivos) (Atlan *et al.*, 1995). Al igual que la detección inmunohistoquímica en el CI canino en la que los CI estudiados son negativos a la detección inmunohistoquímica de receptores de estrógenos  $\alpha$  y positivos de un 55,5% a un 71,4% ante la detección de receptores de progesterona (Pérez-Alenza *et al.*, 2001; Peña *et al.*, 2003).

En la especie humana neoplasias RE positivas o RE y RP positivas responden al tratamiento endocrino, pero los tumores que carecen de tales receptores no (Mc Guire *et al.*, 1980; Nerurkar *et al.*, 1987; Rooney *et al.*, 1993). También la ausencia de receptores de progesterona ha sido correlacionada con un menor intervalo libre de enfermedad y una menor supervivencia total en pacientes con cánceres mamarios. Todo esto parece indicar que la disminución en la expresión del RP está relacionada con malignidad tumoral y confieren un peor pronóstico al tumor mamario. En el CI canino la expresión del receptor de progesterona se ha asociado a la presentación secundaria de la enfermedad, mientras que la ausencia de PR se relaciona con la existencia de metástasis pulmonares (Peña *et al.*, 2003). Mediante los análisis de PCR a tiempo real hemos encontrado una menor expresión del gen del RP en tumores mamarios caninos, tanto carcinomas distintos al CI, como en el CI frente a tejidos mamarios sanos ( $p=0,07$ ).

Los modelos animales como los ratones inmunodeficientes xenotransplantados MARY-X y WIBC-9 son RP negativos (Alpaugh *et al.*, 1999; Shirakawa *et al.*, 2001). Sin embargo Alpaugh *et al.* demostraron que solo la carencia de RE y RP, y la presencia de p53 no conducen al desarrollo

del carcinoma inflamatorio mamario comparando MARY-X con los ratones xenotransplantados no-CI MDA-MB-231 y MDA-MB-468.

En el estudio de expresión realizado sobre RA se ha encontrado menor expresión de este receptor en muestras CI respecto al tejido mamario sano y carcinomas no CI, en contraposición con otros trabajos en los que se observa una mayor expresión inmunohistoquímica del RA en el CI canino respecto a glándulas mamarias no patológicas y otros tumores mamarios (Illera *et al.*, 2003). La expresión inmunohistoquímica en la especie humana del RA ofrece resultados contradictorios respecto al porcentaje de expresión, relación con el tipo histológico, pronóstico y correlación con otros receptores esteroideos (Illera *et al.*, 2003). Y no está claro el mecanismo por el cual los andrógenos ejercen su acción en la glándula mamaria, pudiendo realizarse de manera directa sobre el RA, o de forma indirecta mediante su conversión en estradiol (Maggiolini *et al.*, 1999).

Nuestros resultados apuntan a la activación de esta última ruta metabólica en el carcinoma inflamatorio canino, por dos razones:

- las grandes cantidades de andrógenos (Dihidroepiandrosterona, Androstenediona y Testosterona) encontradas en el carcinoma inflamatorio canino en comparación con otros tumores mamarios no CI (Sánchez-Archidona *et al.*, 2007) que parecen proceder de una síntesis local (Illera *et al.*, 2003; Peña *et al.*, 2003).
- la expresión significativamente más baja de todos los dominios de RA ( $p > 0,01$ ) en las muestras procedentes de CI canino encontradas en nuestros análisis.

Estos dos resultados indicarían que las grandes cantidades de andrógenos encontradas en el tejido afectado de CI canino son proporcionalmente superiores al receptor de andrógenos que podría mediar su acción, de manera que o bien son redirigidos al torrente sanguíneo, o son utilizados en el tejido mamario por otra ruta mediante su conversión en estrógenos. De esta manera no parece que el RA medie solo el efecto androgénico.

La conversión de andrógenos en estrógenos esta mediada por la acción de la enzima aromatasas, que según nuestros resultados se encuentra expresada en el CI como en el resto de tejidos mamarios analizados. Zhou *et al.* encontraron que los andrógenos cuya acción era mediada por el RA en el tejido mamario tenían acciones antiproliferativas (Zhou *et al.*, 2000).

En estudios realizados en la especie humana (Edery *et al.*, 1981) y canina (Sánchez-Archidona *et al.*, 2007) han encontrado mayores cantidades de estrógenos sulfatados (estrón sulfato) en tejidos mamarios neoplásicos con respecto a tejidos mamarios sanos. También se han encontrado concentraciones mayores de este esteroide en tejidos mamarios con cáncer de mama



que en plasma de pacientes postmenopáusicas (Pasqualini *et al.*, 1996). Se ha demostrado que la estrona sulfato juega un papel esencial en la regulación de procesos fisiológicos y patológicos (Pasqualini *et al.*, 1989). La gran concentración (Horbkirk *et al.*, 1993) y vida media de la estrona sulfato (Utsumi *et al.*, 1999) comparada con el estradiol (Thijssen *et al.*, 1987), podría indicar que esta hormona actúa como reservorio para la formación de estrógenos biológicamente activos en el tejido mamario (Pasqualini *et al.*, 1986). Determinaciones cuantitativas realizadas en tejido mamario neoplásico indican que la conversión de estrona sulfato en estradiol vía estrona sulfotransferasa (EST) es de 40 a 500 superior que la conversión de andrógenos en estradiol vía aromatasas (Pasqualini *et al.*, 1996).

La sulfatasa esteroidea cataliza la conversión de sulfato de estrona a estrona, y de  $17\beta$  sulfato de estradiol en  $17\beta$ -estradiol, es decir la conversión de estrógenos sulfatados en sus formas activas, mientras que la enzima estrona sulfotransferasa cataliza la sulfatación de estrona y  $17\beta$ -estradiol.

En los análisis de expresión realizados se encontró menor expresión del gen que codifica la sulfatasa esteroidea en tejido afectado por el CI ( $p=0,01$ ), lo que puede sugerir una menor conversión de estrógenos sulfatados en sus formas activas (estrona y  $17\beta$ -estradiol). Y en el caso de la estrona sulfotransferasa nuestros resultados muestran una mayor expresión de la estrona sulfotransferasa en los carcinomas no CI ( $p=0,02$ ), siendo las muestras de carcinoma inflamatorio mamario canino las que presentan las cantidades menores esta enzima.

También se midieron las enzimas  $17\beta$  hidroxisteroide-deshidrogenasas, 17HSD tipo 1 y 17HSD tipo 2 que están implicadas en la regulación de esteroides: la enzima 17HSD tipo 1 cataliza la conversión de estrona en estradiol, y la enzima 17HSD tipo 2 cataliza la oxidación de estradiol a estrona. En los resultados obtenidos mediante *pools* de ARNm correspondientes a los distintos grupos de animales no parece observarse diferencias de expresión.

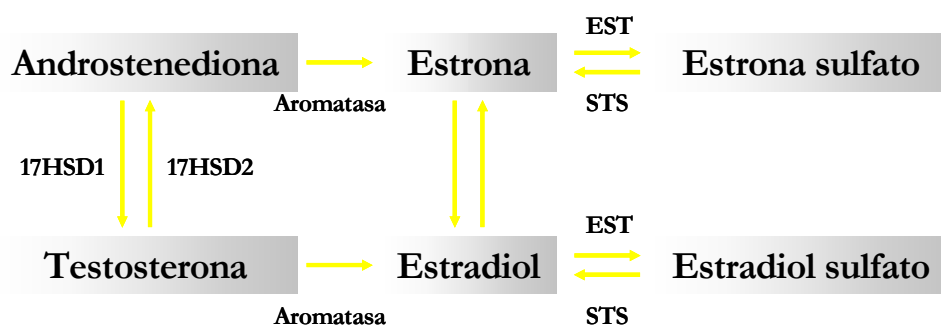
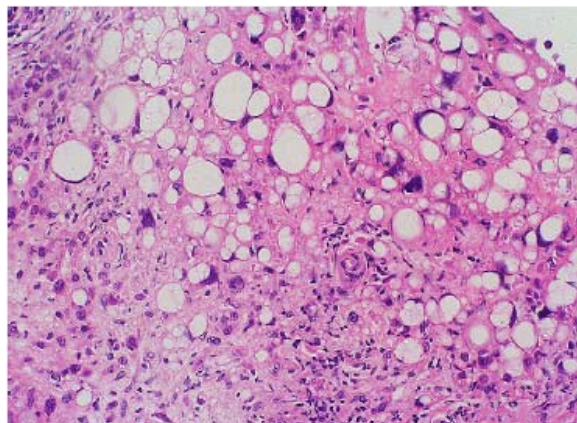


Figura IX.2.1. Ruta metabólica de la biosíntesis y el metabolismo de los estrógenos.

Como conclusión todas estas hormonas mencionadas podrían estar depositándose en forma de gotas lipídicas que actúan como reservorio, hipótesis previa (Peña *et al.*, 2003)

confirmada con nuestros resultados (Sánchez-Archidona *et al.*, 2007), ya que una proporción de CI caninos han sido descritos histológicamente como carcinomas ricos en lípidos (Peña *et al.*, 2003) (Figura IX.2.2). Datos que sería reforzados por los resultados encontrados en CAV1.



**Figura IX.2.2.** Carcinoma inflamatorio mamario canino. Carcinoma rico en lípidos. H-E 40x. Abundantes gotas lipídicas en las células neoplásicas.

### 2.1.2 Enzima sulfotransferasa 1 A 1 (SULT1A1)

Han sido aislados varios ADNs codificantes correspondientes a SULT1A de tejido humano y otras especies como rata, ratón, conejo, vaca y perro. Pero a diferencia de la especie humana que expresa 3 formas distintas de SULT1A, solo se ha encontrado una en el resto de especies. Esto puede sugerir diferencias funcionales de esta enzima en las diferentes especies (Honma *et al.*, 2001).

La enzima SULT1A ejerce funciones importantes en el metabolismo de varios agentes xenobióticos como fármacos y fenoles, y de componentes endógenos como las catecolaminas. Genes de esta subfamilia suelen expresarse de forma ubicua en los tejidos de la especie humana (Dooley *et al.*, 2000).

Se ha encontrado una mayor tasa de metilación de las regiones promotoras P1 y P0 de SULT1A en tumores mamarios malignos frente a tumores benignos y tejido mamario morfológicamente normal. En los tejidos neoplásicos con alto grado de malignidad la metilación aberrante de SULT1A provoca un descenso significativo de la expresión de su ARNm. Además también se ha sugerido que la progresiva metilación de SULT1A podría tener lugar durante el proceso de carcinogénesis (Kwon *et al.*, 2006).

Nuestros resultados de expresión para SULT1A1 coinciden con los resultados del estudio realizado por Kwon *et al.*, mostrando que a medida que el tumor se maligniza disminuye la expresión de SULT1A1. Así encontramos una mayor expresión en el tejido mamario sano,

después en carcinomas distintos al CI y por últimos en el carcinoma inflamatorio ( $p=0,025$ ) que está caracterizado por su gran capacidad de invasión y metástasis.

En otros estudios se ha demostrado que variaciones en SULT1A1 pueden incidir en el pronóstico de los tumores mamarios. Así en individuos con gran actividad de SULT1A1 se han encontrado neoplasias con menor grado histológico, y la variante de SULT1A1 denominada SULT1A1\*1/\*1 ha sido asociada con tamaños tumorales iguales o inferiores a 2 cm (Shatalova *et al.*, 2005).

### 2.3 Angiogénesis

El proceso de angiogénesis consiste en la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos ya existentes. La angiogénesis requiere la expansión de células vasculares endoteliales, bien mediante la proliferación de células endoteliales diferenciadas o por la movilización desde la médula ósea de células endoteliales precursoras que migran hacia la circulación sanguínea periférica hasta incorporarse a los vasos en crecimiento (Asahara *et al.*, 1997; Rafii *et al.*, 2002).

La formación de nuevos vasos sanguíneos es necesaria en distintos procesos biológicos que incluyen embriogénesis y cicatrización, y varios procesos patológicos como diabetes, cáncer e inflamación (Adams *et al.*, 2007).

En los tumores, la proliferación de vasos de neo-formación es un proceso necesario para el crecimiento tumoral. Los nuevos grupos de células neo-formadas necesitan el aporte vascular para continuar su crecimiento. La angiogénesis tumoral involucra múltiples pasos y vías dependientes del balance local entre factores reguladores positivos y negativos, existiendo interacciones entre el tumor, su vascularización, y la matriz extracelular circundante (Casciato *et al.*, 2007). Así el crecimiento angiogénico de los sistemas vasculares sanguíneo y linfático es un ejemplo de la coordinación entre los procesos de proliferación celular, diferenciación, migración, adhesión y transducción de señales intercelulares durante el proceso de morfogénesis (Adams *et al.*, 2007). Mientras está ausente este fenotipo angiogénico, un tumor permanece en estado latente, con el ritmo de proliferación celular en equilibrio con el ritmo apoptótico, incapaz de crecer en tamaño mas allá de unos pocos milímetros. Al establecerse un aporte sanguíneo, se reduce la tasa de muerte celular y el tumor crece con rapidez (Casciato *et al.*, 2001). La angiogénesis provoca un mejor acceso de nutrientes y oxígeno por parte de la células neoplásicas, y permite a las células tumorales metastatizar a tejidos lejanos empleando los nuevos vasos sanguíneos y linfáticos (Cueni *et al.*, 2006; He *et al.*, 2005; Achen *et al.*, 2006). Así la capacidad de controlar el crecimiento

de vasos linfáticos y sanguíneos podría repercutir en beneficios terapéuticos importantes en la lucha contra el cáncer (Adams *et al.*, 2007).

El carcinoma inflamatorio mamario es muy angioinvasivo y presenta elevada angiogénesis, sobre todo de vasos linfáticos (linfangiogénesis) (Van der Auwera *et al.*, 2005), razón por la cual hemos estudiado distintos genes implicados en el proceso de angiogénesis para discernir que genes y rutas metabólicas podrían estar participando en este fenotipo particular.

Aunque el proceso de angiogénesis depende de las interacciones de muchos factores celulares, el principal mediador identificado de esta respuesta es el factor de crecimiento vascular-endotelial (VEGF) y sus receptores (Shibuya *et al.*, 2001; Ferrara *et al.*, 2003; Shibuya *et al.*, 2003). El factor de crecimiento vascular epitelial (VEGF-A) o factor de permeabilidad vascular pertenece a la familia de los factores de crecimiento derivados de plaquetas que incluye al factor de crecimiento de placenta (PIGF), VEGF-B, VEGF-C y VEGF-D (Shibuya *et al.*, 2006; Ferrara *et al.*, 2003). Se han estudiado las funciones del VEGF-A por su aplicación práctica en el tratamiento del cáncer:

Se ha observado que VEGF-A:

- Induce receptores para sí mismo en células endoteliales de vasos sanguíneos maduros no proliferantes. Las células endoteliales normales, que están en reposo, no tienen el receptor hasta que no son expuestas al VEGF-A.
- Puede ser inducido por el oncogen c-ras o por otros oncogenes y factores de crecimiento, que a su vez inducen mayor producción de VEGF-A. Por lo tanto, drogas que modulen la acción de c-ras pueden inhibir la angiogénesis.
- Induce la producción y activación de muchos otros factores de crecimiento que contribuyen a la formación de vasos sanguíneos. Entonces, al bloquear la actividad de VEGF-A también se bloquea la acción de otros factores de crecimiento involucrados en la progresión tumoral.
- A diferencia de los vasos sanguíneos normales que requieren otros factores para su desarrollo normal, en los vasos sanguíneos inducidos por VEGF-A está aumentada la permeabilidad vascular. Así las proteínas plasmáticas inducidas por VEGF-A, como el fibrinógeno, pueden salir de los nuevos vasos, formando un gel esponjoso alrededor del tumor. Este gel contiene VEGF-A, que induce mayor angiogénesis.

- VEGF-A parece evitar la apoptosis en las células endoteliales inducidas. Por lo tanto al inhibir la acción de VEGF-A se esta inhibiendo una de las vías de escape tumoral.

En modelos *in vitro*, como líneas celulares de cáncer mamario, se ha estudiado la expresión de VEGF-A, B, C y D encontrando que VEGF-A y B se expresan en las siete líneas celulares estudiadas; tanto en las que metastatizan a ganglios linfáticos como a las que no (Kurebayashi *et al.*, 1999).

Según nuestros resultados la expresión de VEGF-A se encuentra significativamente aumentada en los carcinomas distintos al CI frente al tejido mamario sano ( $p=0,02$ ), aunque la expresión de este gen en el CI se encuentre inhibida. Para los genes VEGF-B ( $p=0,20$ ) y VEGF-C ( $p=0,34$ ) no se observaron diferencias de expresión entre el tejido mamario sano, carcinomas distintos del CI y CI. La expresión de los genes VEGF-D ( $p=0,008$ ) y VEGFR3 ( $p=0,01$ ) se encontró inhibida en las muestras de CI y tumores no CI. Y en el análisis de VEGFR2 los resultados mostraban la inhibición de la expresión en el CI, pero sin significación estadística ( $p=0,19$ ).

La inhibición de la expresión de VEGF-A en el CI contradice parte de la bibliografía ya existente. Estos estudios anteriores de expresión de VEGF-A se han realizado en modelos *in vitro* (líneas celulares) o modelos *in vivo* (ratones WIBC-9) a diferencia de nuestro estudio que parte de muestras desarrolladas de forma espontánea en la especie canina. El CI canino posee gran similitud epidemiológica, clínica e histopatológica con el CI humano y ha sido propuesto como modelo natural para la enfermedad en al mujer (Pérez-Alenza *et al.*, 2001; Peña *et al.*, 2003), lo que podría conferir a nuestros resultados una mayor semejanza con el proceso tumoral humano.

En modelos *in vivo* como la línea WIBC-9 de ratones originada a partir de mujeres con CI, encontraron sobre-expresión de factores angiogénicos humanos (ANGPT1, VEGF y bFGF), y murinos (flt-1, integrin b3, VEGF y CD31) cuando compararon con modelos distintos del CI (Shirakawa *et al.*, 2001). Este mismo grupo demostró en un estudio realizado mediante técnicas de PCR semicuantitativa una mayor expresión de factores angiogénicos, pero no de los factores linfangiogénicos en ratones WICB-9 respecto a otros modelos no CI, y mediante análisis inmunohistoquímico revelaron poblaciones significativamente mayores de células endoteliales y células endoteliales precursoras en el estroma tumoral del CI frente a otros tumores no CI (Shirakawa *et al.*, 2002). Sin embargo Lerebours *et al.* en un trabajo publicado este año documentan la inhibición de la expresión de VEGF-A en muestras de tejido CI humano de

pacientes que recidivaban tras el tratamiento, utilizando la inhibición de este gen como marcador de peor pronóstico (Lerebours *et al.*, 2008)

Se han descrito en procesos neoplásicos rutas metabólicas alternativas a la angiogénesis por las cuales el tumor podría crecer, proliferar y metastatizar (Pezzella *et al.*, 1997; Holash *et al.*, 1999; Maniotis *et al.*, 1999). Una de estas rutas alternativas es la mimetización vascular (VM) (Maniotis *et al.*, 1999), que consiste en la utilización de estructuras vasculares similares a canales por parte de las células tumorales para obtener nutrientes sin la participación de las células endoteliales. Las estructuras similares a canales, son ricos en laminina, están tapizados por células tumorales, y contienen eritrocitos y plasma. Se piensa que estos canales proporcionan un mecanismo de perfusión y una ruta de diseminación que funciona independientemente o simultáneamente a la angiogénesis (Hendrix *et al.*, 2003). Este fenómeno, se ha demostrado en melanomas humanos y en el ratón xenotransplantado con CI humano WIBC-9 (Shirakawa *et al.*, 2001; Maniotis *et al.*, 1999). La importancia del fenómeno VM se debe a que cuando aparece, es posible que se aumente de forma notable la invasión “vascular” y la rapidez en la diseminación linfática y metástasis linfáticas.

En el CI canino espontáneo, se ha observado con cierta frecuencia, la presencia de unas estructuras tumorales semejantes morfológicamente a capilares linfáticos, que actualmente se identifican como posible VM, integradas por células tumorales semejantes a endoteliales (endothelial-like cells, ELC) (L. Peña, comunicación personal).

La presencia de las estructuras tumorales semejantes a capilares linfáticos, junto con nuestros resultados del análisis de expresión de VEGF-A nos hacen pensar en diferencias, por lo menos en lo que se refiere al proceso angiogénico del CI, con otros carcinomas localmente avanzados y con otros modelos *in vivo* del CI.

VEGF-C y VEGF-D son importantes reguladores de la linfangiogénesis (Karkkainen *et al.*, 2004; Baldwin *et al.*, 2005) y se han postulado como moléculas características del CI humano ya que VEGFR3 o Flt-4 que es uno de los receptores para VEGF-C y VEGF-D está presente en los conductos linfáticos (Shirakawa *et al.*, 2001). Además VEGF-C y VEGF-D promueven las metástasis linfáticas induciendo la formación de nuevos vasos linfáticos relacionados con el tumor (Kurebayashi *et al.*, 1999; Van der Auwera *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2004; Tammela *et al.*, 2005). Algunos estudios han determinado que la invasión vascular en el cáncer mamario es predominantemente de vasos linfáticos (Mohammed *et al.*, 2007).

Bieche *et al.* en 2004, mediante PCR a tiempo real identificaron en muestras de CI humano algunos genes relacionados con la angiogénesis cuya expresión era similar en el CI y en otros tumores mamarios: VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGFR1, VEGFR2 y VEGFR3. Lo

que concuerda con nuestros resultados para los genes VEGF-B y VEGF-C, los cuales se expresan de forma similar en tejido mamario sano, carcinomas distintos del CI y CI.

Un estudio realizado por Al-Mowallad *et al.* no encontró diferencias en los niveles plasmáticos de VEGF-C entre pacientes con cáncer mamario temprano, avanzado o CI y controles sanos. Tampoco encontraron asociación entre VEGF-C, edad, tamaño tumoral, grado histopatológico, supervivencia total o tiempo libre de enfermedad. Y los niveles plasmáticos de VEGF-C no variaban según la presencia de receptores de estrógenos, progesterona y erbB-2 en los pacientes (Al-Mowallad *et al.*, 2007).

En otros estudios realizados en las líneas de ratones WIBC-9, VEGF-C y VEGF-D no han sido detectados (Shirakawa *et al.*, 2001).

VEGF-D solo se ha detectado en líneas celulares de CI y en líneas celulares tumorales desarrolladas a partir de metástasis cutáneas del CI, pero no en otras líneas celulares de cáncer mamario (Kurebayashi *et al.*, 1999). En nuestro caso para el gen VEGF-D se encontró una menor expresión en las muestras de CI y tumores no CI.

En la bibliografía existe controversia acerca de los datos de expresión VEGF-D ya que un estudio llevado a cabo por Van der Auwera *et al.* en 2004, encontró una mayor expresión de los genes KDR, ANGPT1, TIE1, TIE2, FGF-2, VEGF-C, VEGF-D, prox-1 y LYVE-1 en el CI con respecto a tumores mamarios no CI, lo que difiere de nuestros resultados y los resultados de los estudios comentados anteriormente.

Los receptores de los factores de crecimiento vascular epitelial (VEGFRs) son receptores transmembrana tirosina kinasas, dentro de los cuales encontramos VEGFR1 (Flt-1)/soluble VEGFR1 (sFlt-1), VEGFR2 (KDR/Flk-1), y VEGFR3 (Flt-4). Generalmente, VEGFR2 parece ser el receptor que media la acción de VEGF-A (Shibuya *et al.*, 2003).

VEGFR2 se encuentra muy expresado en las células epiteliales y se ha detectado en líneas celulares neoplásicas de varios tejidos (Orre *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2003; Huss *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2002; Speirs *et al.*, 1999). VEGFR1 y VEGFR2 median rutas distintas ya que VEGFR2 se considera el iniciador primario del proceso angiogénico mientras VEGFR1 puede inhibir la angiogénesis en algunos tumores (Zhang *et al.*, 2002). En tumores mamarios primarios normalmente se ha encontrado la co-expresión de VEGFR2 y VEGF-A, y se ha observado que la expresión de ambos aumenta cuando los tumores adquieren un fenotipo angiogénico. Además VEGFR2 se expresa de forma basal en cultivos celulares de células epiteliales mamarias neoplásicas pero muestra un descenso en su expresión en cultivos de células del estroma (Speirs *et al.*, 1999). En este estudio hemos encontrado, tanto en los análisis realizados mediante *pools* como en el análisis de las muestras individualizadas, una inhibición de la expresión en el CI de

VEGFR2, aunque no estadísticamente significativa ( $p=0,19$ ), concordando con los datos de expresión de VEGF-A.

El receptor VEGFR3 se ubica en el epitelio de los vasos linfáticos y se une a VEGF-C y VEGF-D (Achen *et al.*, 1998). Y aunque se expresa predominantemente en los vasos linfáticos han encontrado que se encuentra sobre-expresado en el endotelio vascular de algunos tumores mamarios (Valtola *et al.*, 1999). En nuestros resultados se ha observado una menor expresión significativa ( $p=0,01$ ) del gen del receptor VEGFR3 en el tejido CI, lo que concuerda con la inhibición de VEGF-D en el CI.

Dentro del proceso de angiogénesis las angiopoyetinas son proteínas con importantes funciones. Todas las angiopoyetinas se unen con la misma afinidad al receptor de células endoteliales con actividad tirosina-proteína quinasa específica (TIE2). La activación de este receptor endotelial parece que juega un papel esencial en el crecimiento vascular y diferenciación (Yancopoulos *et al.*, 2000; Conway *et al.*, 2001). La angiopoyetina 1 (ANGPT1) activa este receptor induciendo la autofosforilación del dominio tirosina quinasa, mediando interacciones recíprocas entre endotelio, matriz extracelular y mesénquima. Sin embargo la activación de TIE2 por parte de ANGPT1 no estimula la mitogénesis. Por el contrario la angiopoyetina 2 (ANGPT2) bloquea la activación de TIE2 mediada por ANGPT1 y la migración endotelial (Maisonpierre *et al.*, 1997; Witzebichler *et al.*, 1998; Teichert-Kuliszewska *et al.*, 2001). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que en ciertas circunstancias ANGPT2 puede estimular a TIE2, lo que sugiere que la acción agonista o antagonista de ANGPT2 frente a TIE2 depende del contexto (Kim *et al.*, 2000; Teichert-Kuliszewska *et al.*, 2001; Gale *et al.*, 2002). Así se ha visto en cultivos celulares de células endoteliales que en grandes concentraciones y con un tiempo de exposición elevado ANGPT2 puede actuar como agonista o agonista parcial de TIE2. Y se ha sugerido que ANGPT2 actúa como antagonista en la vasculatura sanguínea y como agonista en el desarrollo de la vasculatura linfática (Kim *et al.*, 2000; Teichert-Kuliszewska *et al.*, 2001).

Se han identificado dos ligandos más de TIE2 con efectos dispares (Valenzuela *et al.*, 1999), pero debido a su selectividad ninguno de los ligandos de TIE2 identificados se une o activa al receptor TIE1 (Peters *et al.*, 2004).

La ruta metabólica ANGPT/TIE2 juega un papel esencial en la remodelación y maduración/estabilización de la vasculatura embriogénica (Peters *et al.*, 2004) y del animal adulto. Por ejemplo TIE2 se expresa en la nueva vascularización del cuerpo luteo al desarrollarse. Así Maisonpierre *et al.* (1997) encontraron mediante técnicas inmunohistoquímicas que ANGPT1 y ANGPT2 también se expresaban en el cuerpo luteo, localizándose ANGPT2 en el final de los vasos en proliferación y ANGPT1 detrás. Basándose en este patrón de expresión se sugirió que



ANGTP2 mediaba la inhibición de TIE2 “desestabilizando” así el vaso para hacerlo receptivo a otros factores de crecimiento como VEGF. Posteriormente ANGTP1 mediaría la activación de TIE2 provocando la remodelación y estabilización de la neovasculatura.

De forma similar al ovario, TIE2 se expresa en el endotelio de nuevos vasos formados después de una lesión cutánea. Mediante análisis realizados con Western Blot, encontraron que la expresión de TIE2 en la piel aumentaba durante los procesos de angiogénesis posteriores a una herida, y disminuía en la regresión de los nuevos vasos formados. Sorprendentemente TIE2 se expresaba y fosforilaba también en la vasculatura quiescente de la piel normal. Utilizando técnicas inmunohistoquímicas observaron que TIE2 se expresaba en el endotelio de todos los tejidos adultos examinados y en casi todos los vasos sanguíneos incluyendo arterias, venas y capilares (Motoike *et al.*, 2000; Theis *et al.*, 2001; Forde *et al.*, 2002; Vicent *et al.*, 2003).

También se ha estudiado la expresión de TIE2 en muestras de tumores mamarios (Peters *et al.*, 1998), encontrando una proporción mayor de microvascularización que expresaban TIE2 en los tumores mamarios comparando con tejido mamario normal. En el caso de tumores con fenotipos invasivos la expresión de TIE2 se concentraba en los denominados “puntos calientes vasculares” situados en el borde del vaso. También se ha confirmado la expresión de TIE2 en otros tumores de la especie humana como neoplasias ováricas, hepatocelulares y glioblastomas (Stratmann *et al.*, 1998; Hayes *et al.*, 2000; Hata *et al.*, 2002; Tanaka *et al.*, 2002).

En el caso del CI se ha observado una mayor expresión medida mediante PCR a tiempo real de los genes ANGPT1, TIE1, TIE2 y bFGF frente a otros tumores mamarios (Van der Auwera *et al.*, 2003). Lo que concuerda con nuestros resultados para el receptor TIE2, ya que este gen se expresa más en tejido CI que en carcinomas no CI, aunque su expresión en las muestras tumorales en general se encontrase inhibida frente al tejido mamario sano ( $p=0,03$ ).

La sobre-expresión de ANGTP1 en modelos tumorales conlleva un descenso en el crecimiento tumoral. Efecto posiblemente relacionado con la estabilización vascular mediada por ANGTP1 que lo hace al tumor resistente al estímulo angiogénico (Hayes *et al.*, 2000; Shim *et al.*, 2001; Hawighorst *et al.*, 2002; Stoeltzing *et al.*, 2003). En nuestros resultados la expresión de ANGPT1 no fue significativamente diferencial entre el carcinoma inflamatorio, carcinomas no CI y tejido mamario sano ( $p=0,61$ ).

Algunos estudios han demostrado que ANGTP2 se encuentra sobre-regulada en la vasculatura tumoral (Stratmann *et al.*, 1998; Tanaka *et al.*, 1999; Koga *et al.*, 2001). De acuerdo con el papel que desempeña ANGTP2 en la angiogénesis tumoral, se ha localizado en los nuevos vasos que proliferan entre el tejido tumoral y el tejido sano (Holash *et al.*, 1999; Zagzag *et al.*, 1999), expresándose únicamente donde haya procesos de remodelación vascular. Sin embargo en

nuestro estudio no se midió la expresión relativa de forma individual en el gen ANGPT2 debido a los resultados obtenidos mediante *pools* que mostraban igualdad de expresión entre el CI, carcinomas distintos del CI y tejido mamario normal. Esto podría deberse a la localización delimitada de ANGPT2 en los nuevos vasos en formación, ya que la extracción de ARNm no se realiza únicamente a partir de las regiones tumorales donde hay procesos de remodelación vascular. Explicación que podría extenderse a otros genes como ANGPT1 o TIE2. Sin embargo en un tejido con un fenotipo tan angioinvasivo como el CI las zonas de formación vascular deberían ser abundantes. Lo que nos lleva a pensar de nuevo en que esos nuevos vasos pueden estar formándose a partir de células tumorales semejantes a células endoteliales (endothelial-like cells, ELC) (L. Peña, comunicación personal) que forman estructuras tumorales semejantes morfológicamente a capilares linfáticos (posible VM), en vez de seguir el proceso de angiogénesis que tiene lugar en otros tumores mamarios.

Otro gen interesante para evaluar la angiogénesis es CD34, que codifica la proteína homónima. La proteína CD34 es un antígeno de superficie celular selectivamente expresado en células progenitoras hematopoyéticas. Este gen se ha asociado a varias patologías como neoplasias gastrointestinales, leucemia, tumores pancreáticos y el sarcoma de Ewing, además participa en rutas metabólicas de adhesión celular, linaje de células hematopoyéticas y señalización de IL 17, y en procesos de adhesión celular y migración leucocitaria. La proteína CD34 se ha localizado en la cara externa y formando parte de la membrana plasmática, y en el núcleo celular.

En nuestros resultados hemos observado, mediante PCR a tiempo real, la inhibición de la expresión de CD34 en las muestras de carcinomas no CI, y fundamentalmente en el CI ( $p=0,05$ ), lo que podría sugerir una menor presencia de células progenitoras hematopoyéticas en esta patología.

El gen LIVE-1, también denominado XLKD1, ha sido asociado previamente al cáncer de mama, y codifica la proteína integral de membrana tipo 1 con actividad transportadora del ácido hialurónico que se expresa preferencialmente, aunque no exclusivamente, en los vasos linfáticos (Banerji *et al.*, 1999; Beasley *et al.*, 2002; Prevo *et al.*, 2001). También se expresa en poblaciones discretas de macrófagos activados, hígado y bazo, y en general en lugares donde se produce la absorción y degradación del ácido hialurónico (Carreira *et al.*, 2001; Grant *et al.*, 2002). Sin embargo LIVE-1 no se ha detectado en el endotelio de vasos sanguíneos, excepto en los vasos sanguíneos pulmonares (Prevo *et al.* 2001).

La metodología que se ha postulado más exacta para determinar la tasa de síntesis linfática o linfangiogénesis es la medición de los niveles de ARNm del gen LIVE-1 mediante PCR a tiempo real (Cunnick *et al.*, 2001). Al realizar nosotros esta técnica hemos encontrado la mayor

expresión de este gen en el tejido mamario sano, a continuación en los carcinomas distintos del carcinoma inflamatorio y por último en el CI, tanto en el análisis realizado mediante *pools* como en el realizado individualmente ( $p=0,18$ ), no obstante en este último ensayo sin significación estadística. Tampoco fueron significativos los resultados obtenidos por Cunnick *et al.* que observaban una mayor expresión de LIVE-1 en los tumores mamarios que presentaban metástasis en nódulos ganglionares frente a tumores que no habían metastatizado (Cunnick *et al.*, 2001). En este mismo estudio encontraron que el tejido mamario sano y las células endoteliales de los vasos sanguíneos expresaban LIVE-1, a diferencia de la línea celular MDA MB 231 de células neoplásicas mamarias donde no observaron expresión de LIVE-1 (Cunnick *et al.*, 2001).

No se ha encontrado asociación entre el número de vasos linfáticos positivos para LYVE-1 y el número de vasos linfáticos positivos para CD31 y VEGFR3. Tampoco entre el número de vasos positivos para LIVE-1 y la expresión de VEGF-D (Bono *et al.*, 2004).

El último gen estudiado relacionado con la angiogénesis fue el gen VWF que codifica el factor von Willebrand. Se ha observado en distintos estudios, aumentos en los niveles plasmáticos del antígeno del factor de von Willebrand (vWF:Ag) en cánceres de laringe, cabeza, cuello y próstata, asociados al crecimiento endotelial durante la angiogénesis (Zhou *et al.*, 1992; Hodak *et al.*, 1993). Así este aumento de los niveles plasmáticos de vWF:Ag estaría reflejando la proliferación endotelial y/o formar parte de la fase aguda de la reacción de respuesta a deficiencias vasculares (Giustolise *et al.*, 1984; Pottinger *et al.*, 1989). Algunos estudios sugieren que el aumento de los niveles plasmáticos de vWF:Ag en pacientes de cáncer mamario puede ser un factor pronóstico (Sweeney *et al.*, 1990; Paczuski *et al.*, 1999).

También han demostrado un incremento en los niveles plasmáticos del antígeno del factor de von Willebrand (vWF:Ag) en distintos procesos patológicos como enfermedades hepáticas, diabetes mellitus, infarto de miocardio, inflamación aguda y enfermedades del tejido conectivo, probablemente como resultado del daño de células endoteliales (Lufkin *et al.*, 1979; Giustolise *et al.*, 1984; Castillo *et al.*, 1977; Pottinger *et al.*, 1989; Gordon *et al.*, 1987).

En modelos experimentales, VWF se ha involucrado en la patogénesis de metástasis por la promoción en la unión de células tumorales a las plaquetas. La formación de émbolos de células heterotípicas aumenta la probabilidad de unión de células neoplásicas a la superficie endotelial (Gassic *et al.*, 1973; Nierodzik *et al.*, 1992).

Según nuestros resultados obtenidos mediante el análisis de varianza de 4 *pools* para cada uno de los grupos, se observan diferencias de expresión entre los distintos fenotipos ( $p=0,02$ ), siendo los carcinomas no CI el grupo con menor expresión, aunque también encontramos inhibición en la expresión en tejidos CI. Sin embargo aunque en el estudio de muestras

individualizadas se mantiene la menor expresión de VWF en carcinomas no CI y CI, baja la significación estadística ( $p=0,09$ ), manteniendo una tendencia “sugereente”. Así los resultados podrían reflejar que no se está produciendo proliferación endotelial o metástasis debidas a la promoción en la unión de células tumorales a las plaquetas, sino que los procesos de angiogénesis y metástasis en el CI siguen otras rutas tales como la ya descrita VM o “Vascular Mimicry”.

### 2.3 Adhesión celular y transducción de señales

El comportamiento “maligno” de un tumor depende de 1) su crecimiento incontrolado, 2) su comportamiento invasivo, y 3) su capacidad de metastatizar. La moléculas de adhesión contribuyen a todas estas características.

La molécula de adhesión celular plaquetaria endotelial (PECAM) se expresa de manera constitutiva en el endotelio, plaquetas y células del sistema inmunológico interviniendo en funciones de migración transendotelial y angiogénesis (Newman *et al.*, 1990). Esta molécula también se denomina CD31. Juega un papel importante en la migración de los leucocitos a través del endotelio (Muller *et al.*, 1993; Muller *et al.*, 1999) y como receptor de la señal leucocitaria (Jackson *et al.*, 1997).

La transfección de PECAM a células MDA-MB-231 provoca la reducción de su crecimiento, pérdida de la expresión de CD44 y la adquisición de morfología ductal. El mismo efecto se puede observar *in vivo* en el carcinoma *in situ* (Righi *et al.*, 2003).

En un estudio realizado con microarrays de PECAM y endoglina, cuantificando su expresión mediante sistemas de análisis de imagen, no encontraron asociación entre esta expresión y la encontrada mediante técnicas inmunohistoquímicas realizadas a partir de secciones de parafina. Además la expresión de PECAM no se correlacionaba con la supervivencia total de los pacientes (Charpin *et al.*, 2004). En nuestros resultados no se encontró una expresión significativamente diferente del gen PECAM comparando muestras de CI, carcinomas no CI y tejido mamario sano ( $p=0,26$ ), aunque sí se observó una tendencia a estar inhibida su expresión en el tejido CI. Esta tendencia podría implicar una disminución en la actividad de los procesos en los que participa PECAM como la migración de los leucocitos a través del endotelio o el proceso de angiogénesis.

El gen ESAM participa en rutas de adhesión celular y migración transendotelial, y en el proceso de adhesión moléculas homofílicas. Estudios realizados mediante las técnicas de Northern blot e hibridación *in situ* revelan que la expresión de ARNm de ESAM se encuentra restringida en la células endoteliales vasculares durante el desarrollo y la edad adulta. Estudios

funcionales *in vivo* sugieren que ESAM media interacciones intercelulares hemofílicas importantes en el desarrollo de células endoteliales y el proceso de angiogénesis (Hirata *et al.*, 2001).

La proteína ESAM está expresada específicamente en el endotelio y no en el epitelio. Se colocaliza con tres marcadores de uniones ocluyentes; Ocludina, Claudina 5 y ZO-1 en capilares musculares y cerebrales. No se ha encontrado expresión de ESAM en leucocitos en sangre periférica en ratones, sin embargo si se ha encontrado gran expresión de ESAM en megacariocitos y plaquetas activadas (Hirata *et al.*, 2001). En el análisis que realizamos para determinar diferencias de expresión de ESAM entre individuos con CI, carcinomas no CI y tejido mamario sano no se encontraron diferencias significativas ( $p=0,24$ ), aunque los resultados mostraba inhibición en la expresión del gen en el tejido CI, lo que sugeriría según la localización de la expresión de ESAM en células endoteliales, meacariocitos y plaquetas activadas (Hirata *et al.*, 2001), una menor presencia de estos tipos celulares dentro del tejido CI.

La expresión de la proteína trombospondina (TSP-1) está regulada por factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de plaquetas, TGF $\beta$ , el factor de crecimiento fibroblástico y por p53. Pérdidas en la actividad normal de p53 se han asociado con la falta de expresión de TSP-1.

Estudios en tumores de características invasivas han localizado TSP-1 en el estroma tumoral, y han demostrado una asociación inversa entre la presencia de TSP-1 y la angiogénesis tumoral, evaluada mediante densidad microvascular (Campbell *et al.*, 1998; Grant *et al.*, 1998; Kawahara *et al.*, 1998; Volm *et al.*, 1999).

Otros estudios realizados en neoplasias mamarias han localizado TSP-1 en la membrana basal de conductos mamarios que mostraban cambios fibroquísticos, en conductos en el carcinoma *in situ*, y el estroma que rodeaba carcinomas ductales invasivos (Cleazardin *et al.*, 1993; Tuszyński *et al.*, 1994; Wong *et al.*, 1992). La expresión en el estroma se pierde en carcinomas *in situ* de características histológicas más agresivas. Y no se ha encontrado relación entre su presencia y la densidad de microvascularización en el carcinoma *in situ* (Rice *et al.*, 2002).

En la pasada década se observaron numerosas evidencias que apuntan a la acción de trombospondina 1 y 2 como factores antitumorales en el cáncer de mama (Good *et al.*, 1990; Dameron *et al.*, 1994; Weinstat-Saslow *et al.*, 1994; Bertin *et al.*, 1997; Gasparini *et al.*, 2001; Rodriguez-Manzanque *et al.*, 2001; Rice *et al.*, 2002;).

El mecanismo primario para la acción angiostática de las trombospondinas es su unión al receptor de trombospondinas (TSP) o CD36. CD36 se expresa en células endoteliales de la microvascularización y parece regular la movilidad y proliferación de células endoteliales, actividades necesarias en la angiogénesis (Dawson *et al.*, 1997). Existen otras posibilidades

adicionales en la regulación de la angiogénesis. TSP-1 puede inducir directamente la apoptosis endotelial (Guo *et al.*, 1997; Jimenez *et al.*, 2000). También puede inhibir las metaloproteinasas de matriz como la metaloproteinasa 9 que activa VEGF-A (Rodriguez-Manzaneque *et al.*, 2001). En nuestros resultados THBS1 se expresaba más en los carcinomas mamarios no CI que en el resto de los grupos ( $p=0,05$ ), pero también en el CI encontramos sobre-expresión de THBS1 respecto al tejido mamario sano, lo que podría indicar un aumento de la actividad angiostática, bien por la inducción de la apoptosis endotelial (Guo *et al.*, 1997; Jimenez *et al.*, 2000), hipótesis que se complementaría con nuestros resultados de una menor expresión de ESAM, o bien por la inhibición de la metaloproteinasa de matriz 9 que implicaría la inhibición de VEGF-A (inhibición que también muestran nuestros resultados).

Recientemente se ha encontrado en un clon no metastático de una línea celular de cáncer mamario humano una elevación de 15 veces en la expresión de TSP-1 (Urquidi *et al.*, 2002), lo que no se ha asociado con un descenso en la vascularización de tumores primarios en este clon, sugiriendo que otros mecanismos además de los angiostáticos deben tener lugar. Con respecto a nuestros resultados este estudio implica que se debería investigar más a fondo el papel de THBS1 como agente angiostático en el CI.

Las células endoteliales de las venas umbilicales humanas ni expresan CD36 ni contribuyen a la respuesta angiogénica (Dawson *et al.*, 1997), sin embargo la expresión del receptor de trombospondinas CD47, conduce a un aumento de la apoptosis bajo condiciones de flujo sanguíneo bajo o turbulento (Freyberg *et al.*, 2000; Freyberg *et al.*, 2001). Manna *et al.* publicaron que ciertos anticuerpos monoclonales de CD47 y el péptido agonista de CD47 llamado 4N1K derivado de TSP-1 puede inducir una nueva forma de apoptosis en células T activadas y transformadas (Pettersen *et al.*, 1999; Manna *et al.*, 2003), en células de la leucemia linfocítica crónica (Mateo *et al.*, 1999), y en células de las arterias primarias del músculo liso (Manna *et al.*, 2003).

CD47 se expresa en células neoplásicas mamarias (Chandrasekaran *et al.*, 1999), y se ha observado que anticuerpos monoclonales y ligandos agonistas de CD47 pueden inducir la muerte de células cancerígenas mamarias derivadas de varias líneas aisladas (Manna *et al.*, 2004). Esta muerte celular se produciría por el descenso de AMP cíclico intracelular, efecto que depende de la proteína quinasa activa A (PKA). Sin embargo EGF puede proteger a las células neoplásicas mamarias de distintos agentes apoptóticos, como CD47, mediante la vía PKC dependiente (Manna *et al.*, 2004).

Los resultados del análisis que realizamos mediante *pool*es no mostraban diferencias evidentes de expresión de CD34 entre los distintos tejidos estudiados.

La proteína codificada por este gen se denomina endoglina o CD105. Se ha encontrado una gran expresión de endoglina en células endoteliales de vasos sanguíneos en tumores, pero no en la mayoría de tejidos normales (Kumar *et al.*, 1996; Fonsati *et al.*, 2001). Además se ha observado que la inmunotoxina CD105 inhibe el crecimiento de tumores mamarios en ratones inmunodeficientes (Seon *et al.*, 1997; Matsuno *et al.*, 1999).

Según Kumar *et al.* la expresión de endoglina refleja la neoangiogénesis y la activación endotelial en los carcinomas mamarios, pudiendo ser empleada su detección como factor pronóstico (Kumar *et al.*, 1999). Es un potencial candidato para la terapia antiangiogénica específica mediante anticuerpos anti-CD105 (Matsuno *et al.*, 1999).

Distintos estudios inmunohistoquímicos realizados en neoplasias mamarias han utilizado anticuerpos monoclonales frente a antígenos endoteliales como CD34, PECAM y el factor de von Willebrand (Gasparini *et al.*, 1996; Vermeulen *et al.*, 1996; Toi *et al.*, 1996), sin embargo pocos han estudiado la asociación entre la expresión inmunohistoquímica de endoglina y el pronóstico de la enfermedad, mostrando que la marcada expresión de endoglina (y no de CD34) se correlaciona con peor supervivencia (Kumar *et al.*, 1999). En la misma línea de investigación Dales *et al.* encontraron que la expresión inmunohistoquímica de endoglina es marcador de riesgo metastático y mal pronóstico (Dales *et al.*, 2003). Sin embargo en nuestros análisis no se han observado diferencias de expresión del gen endoglina en los estudios realizados en *pools* ni en los realizados en las muestras de forma individualizada ( $p=0,94$ ), lo que podría estar mostrando que el proceso angiogénico no está incrementado en el síndrome del CI, ya que según Kumar *et al.* la expresión de endoglina refleja la neoangiogénesis y la activación endotelial en los carcinomas mamarios, y esta patología emplea otras rutas que le confieren su fenotipo altamente invasivo y metastático.

Una de las proteínas más abundantes y dinámicas de la matriz extracelular (ECM) es la glicoproteína fibronectina. Esta proteína participa en procesos de adhesión celular y migración incluyendo procesos de embriogénesis, coagulación, inmunitarios y metástasis. En varias patologías se produce un aumento plasmático de fibronectina, hasta que una serie de proteasas neutrales la rompen produciendo distintos productos proteolíticos, que en algunos casos y de forma inesperada pueden inducir la transformación maligna (Labat-Robert *et al.*, 2002). Además, se sabe que uno de los signos tempranos de la transformación maligna es la fragmentación de la fibronectina pericelular junto con la producción alterada de esta proteína en el estroma tumoral (Labat-Robert *et al.*, 2002). La cantidad de ARNm de fibronectina detectada en el estroma tumoral es diferente entre carcinomas y tejidos normales. También encontramos elevada fragmentación de

fibronectina en inflamaciones crónicas como la artritis (Carsons *et al.*, 1985), úlceras crónicas (Wysocki *et al.*, 1990), y enfermedad periodontal (Talonpoika *et al.*, 1993).

La organización fibrilar de la fibronectina y otras proteínas de ECM está regulada y modificada durante la génesis del estroma (Silzle *et al.*, 2002). Se sabe que el estado físico de la fibronectina regula la composición y estabilidad de las fibrillas de la ECM y la adhesión de las células con la matriz (Sottile *et al.*, 2002). Por lo tanto algunos autores asumen que el patrón y organización topográfica de la matriz afectada por el tumor es directamente dependiente de su estado fibroblástico, y al mismo tiempo un reflejo de las características de la ECM.

La fibronectina puede expresarse en diferentes cantidades y patrones, así como en distintas variantes de splicing que son indicativas del tipo y estado de formación del estroma (Schor *et al.*, 1994; Loridon-Rosa *et al.*, 1990; Schor *et al.*, 2003; Fukuda *et al.*, 2002). La presencia o ausencia de estas variantes de splicing dentro del estroma pueden predecir el potencial de desarrollo tumoral. Mayor expresión de fibronectina junto con una mayor expresión de colágeno y tenascina-C, entre otras, altera las interacciones célula-matriz del estroma. Estas interacciones son modificadas mediante factores solubles como TGF- $\beta$  1, con un papel importante en la dinámica del estroma tumoral (Labat-Robert *et al.*, 2002). Las interacciones celulares con la fibronectina aumentan la activación de MMP2 mediante un mecanismo que involucra a MMP1 (Stanton *et al.*, 1998).

Los splicing alternativos en 3 localizaciones del pre-ARNm de la fibronectina humana generan aproximadamente 20 isoformas distintas (French-Constant *et al.*, 1995; Kornblihtt *et al.*, 1996), alguna de las cuales se expresan preferencialmente en células transformadas y tumores (Kaczmarek *et al.*, 1994; Midulla *et al.*, 2000) y se cree que contribuyen a la patogénesis del cáncer (Castellani *et al.*, 1994; Labat-Robert *et al.*, 2002). En los estudios de expresión diferencial que hemos realizado entre muestras de CI canino, muestras de carcinomas mamarios no CI y tejido mamario sano mediante *pools* de ARNm parece observarse una disminución en la expresión del gen de la fibronectina 1 en los carcinomas mamarios no CI, sin embargo en la especie canina no están descritas las distintas isoformas de ARNm para el gen fibronectina 1 consecuencia del splicing alternativo, y por lo tanto este estudio podría no hacer referencia a las isoformas que parecen estar expresándose preferencialmente en células transformadas y tumores.

Las cadherinas son moléculas de adhesión homofílicas que participan en las uniones entre células de la misma extirpe y mantienen la arquitectura tisular. Se relacionan inversamente con el grado de diferenciación celular y su pérdida de expresión en tumores se asocia con una mayor capacidad metastatizante. (Takeichi *et al.*, 1993).



Este gen pertenece a la superfamilia de las cadherinas y está localizado en la región del clúster cadherina-sexto, en el brazo largo del cromosoma 16. Está implicado en pérdidas de heterocigosis en cánceres mamarios y protáticos.

Funciona como una cadherina clásica transmitiendo a las células la capacidad de adherirse homofilicamente, y realiza un papel importante en el control de la cohesión y organización de las uniones intercelulares.

La cadherina vascular endotelial o cadherina 5 o CD144 solo se expresa en células endoteliales. Estudios inmunohistoquímicos de cadherina 5 muestran diferencias significativas de la expresión de la misma en microvasculación en tumores comparando con tejidos no tumorales. Sin embargo en este mismo estudio no se encontraron diferencias significativas en el número de vasos teñidos con PECAM o el factor VIII; aunque si se encontró una tinción incrementada en otras estructuras de la muestra y en general. Estudios mediante Q-PCR revelan niveles elevados de cadherina 5 y PECAM en muestras tumorales comparadas con tejido background, pero no del factor VIII. La expresión tanto de cadherina 5 como de PECAM se encuentra significativamente reducida en carcinomas lobulares frente a carcinomas ductales, no así la del factor VIII (Martín *et al.*, 2005).

En los estudios que hemos realizado mediante el análisis de expresión de 4 *pools* para cada uno de los grupos de animales, CDH5 se expresa de forma similar en los distintos tejidos estudiados ( $p=0,969$ ), de manera que en el fenotipo metastatizante del CI no participa la inhibición de la expresión de CDH5, ya que su pérdida de expresión en tumores ha sido asociada por Takeichi *et al.* con una mayor capacidad metastatizante.

Los resultados de expresión obtenidos para PECAM, ESAM y THBS1 fundamentalmente refuerzan la hipótesis de que en el CI canino existen rutas metabólicas alternativas a la angiogénesis por las cuales el tumor crece, prolifera y metastatiza como podría ser la VM.

## 2.4 Invasión y metástasis

Los procesos de invasión y metástasis son factores limitantes en la cura del cáncer mamario en general. Las células tumorales en ocasiones invaden tejidos vecinos y sobreviven en un sitio ectópico. El término invasión indica la penetración en un territorio adyacente y su ocupación. Esta invasión permite a las células tumorales entrar a la circulación sanguínea, a partir de donde pueden colonizar órganos distantes y eventualmente formar un tumor secundario, llamado metástasis. La capacidad de invasión de los tumores les permite penetrar en el interior de los vasos sanguíneos, linfáticos y cavidades corporales, lo que les permite diseminarse.

En varias etapas dentro de la cascada metastática es necesaria la remodelación y la degradación de los componentes de la matriz extracelular por las proteinasas. Las principales proteinasas que participan en la degradación de la matriz extracelular son las metaloproteinases de matriz (MMPs) y los activadores del plasminógeno (PAs) (Baker *et al.*, 2002).

El sistema de MMPs está formado por al menos 20 proteínas en la especie humana, las cuales comparten homología en su secuencia aminoacídica y en su dominios (Matrisian *et al.*, 1992; Ennis *et al.*, 1994; Birkedal-Hansen *et al.*, 1993). Las MMPs se clasifican en 5 subclases según su sustrato, denominándose colagenasas, gelatinas, estromelisin, metaloproteinases de membrana y otras metaloproteinases.

Estas enzimas forman parte de una familia de más de 10 endopeptidasas que son expresadas a niveles bajos en los tejidos adultos normales, pero cuya expresión se eleva rápidamente en procesos de remodelación tisular normales y patológicos tales como el desarrollo embrionario, la reparación tisular, la inflamación y durante la diseminación tumoral.

Dentro de los inhibidores tisulares de metaloproteinases (TIMPs) el TIMPs-1 es el inhibidor mas conocido y ha sido aislado de una amplia variedad de tejidos y fluidos corporales. (Gómez *et al.*, 1997). Aunque los TIMPs no solo inhiben algunas MMPs sino que también pueden activarlas (Lambert *et al.*, 2004).

Para que se produzca la proteólisis de la matriz extracelular las concentraciones activas de proteinasas deben superar a las de los inhibidores. Por lo tanto es probablemente el balance global de concentraciones de proteinasas e inhibidores el que determina si se produce degradación de la matriz extracelular en los procesos de degradación y metástasis *in vivo* (Baker *et al.*, 2002). En las neoplasias, la proteólisis está anormalmente regulada, favoreciéndose la degradación de la matriz extracelular, lo que ayuda a la invasión y metástasis tumoral (Baker *et al.*, 2002).

La degradación de la matriz extracelular por las proteinasas está estrechamente regulada a varios niveles, incluyendo la activación de las proteinasas latentes. Las MMPs son secretadas por las células como formas latentes parcialmente activadas y requieren para su activación completa la eliminación por parte de proteinasas de su dominio propéptido (Nagase *et al.*, 1997). La presencia de inhibidores tejido específicos de metaloproteinases (TIMPs) proporciona un segundo nivel de regulación (Matrisian *et al.*, 1990; Cottam *et al.*, 1993). Finalmente tanto proteinasas como inhibidores son regulados a nivel transcripcional.

La membrana basal celular está formada por colágeno tipo IV que ejerce de barrera contra la invasión y metástasis cancerígena. Dentro de las MMPs, MMP-2 y MMP-9 tienen actividad gelatinasa y también son conocidas como colagenasas tipo IV. La actividad tisular de MMP-2 se

asocia con malignidad y mal pronóstico en tumores mamarios humanos y caninos (Garbett *et al.*, 1999; Loukopoulos *et al.*, 2003). De hecho se ha observado la participación de MMP-2 y MMP-9 en procesos de iniciación tumoral, crecimiento y metástasis en cáncer mamario (Duffy *et al.*, 2000). Sin embargo se han encontrado resultados contradictorios en una gran cantidad de publicaciones acerca del papel de las gelatinasas y sus inhibidores en las neoplasias mamarias humanas (Matrisian *et al.*, 1999; McCawely *et al.*, 2000; Foda *et al.*, 2001; Fuberg *et al.*, 2001; Giannelli *et al.*, 2004; Würtz *et al.*, 2005; Kuvaja *et al.*, 2005).

Grieu *et al.* encontraron un polimorfismo de nucleótido simple (SNP) en la región promotora de MMP-2 que pudo ser asociado con características fenotípicas y pronóstico en cánceres mamarios humanos dependiendo de la expresión del receptor de estrógenos en esos tumores. Así pacientes RE  $\alpha$  negativos que eran homocigotos para la mutación, se asociaban con peor supervivencia, y en pacientes RE  $\alpha$  positivos la presencia de los alelos mutados en homocigosis se asociaba con tendencia a una mejor supervivencia (Grieu *et al.*, 2004).

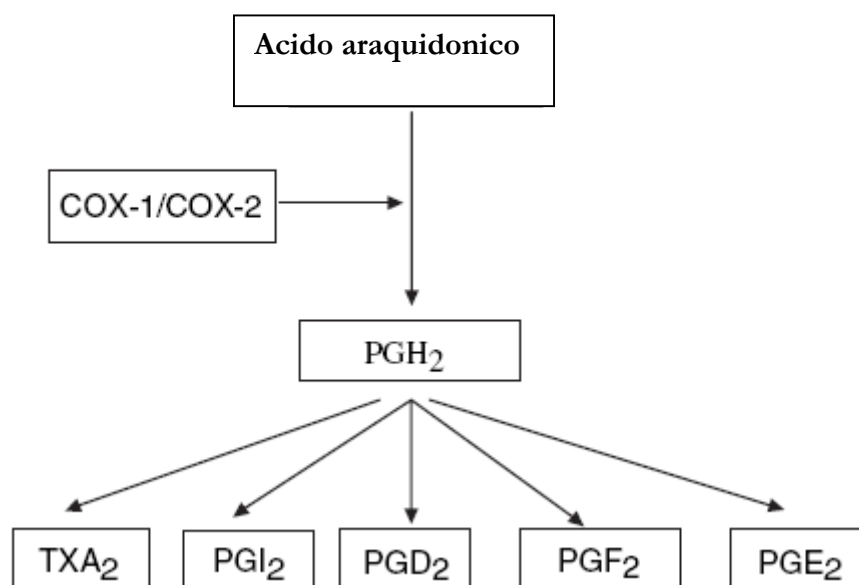
En carcinomas mamarios caninos se ha descrito un aumento de la expresión de MMP2 mediante técnicas inmunohistoquímicas (Hirayama *et al.*, 2002), sin embargo no se ha logrado relacionar este aumento de la expresión con la progresión de la enfermedad o con un tipo histopatológico determinado. Además en estos estudios tampoco pudieron diferenciar la forma latente de MMP-2 con la forma activa, midiendo la expresión conjuntamente (Papparella *et al.*, 2002). En los análisis de expresión que realizamos entre los distintos fenotipos para el gen MMP2, parece que este gen está inhibido en el caso del CI (CI=9,40; carcinomas no CI= 10,83; tejido mamario sano=15,66), aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $p=0,16$ ), por lo que una de las hipótesis plantearía que en esta patología se activan mayoritariamente otros genes durante el proceso invasivo.

## 2.5 Genes relacionados con la ruta del ácido araquidónico

Las enzimas ciclooxigenasas COX-1 y COX-2 catalizan la formación de prostaglandinas a partir del ácido araquidónico mediante su actividad ciclooxigenasa y peroxidasa que secuencialmente transforman el ácido araquidónico en la prostaglandina G2 (PGG2) y en PGH2. Posteriormente isomerasas específicas convierten PGH2 en varios eicosanoides y tromboxanos (Figura IX.2.3).

COX-1 se expresa de forma constitutiva mientras que COX-2 es inducida por distintos estímulos extracelulares como factores de crecimiento, citoquinas, promotores tumorales, proliferación peroxisomal, hipoxia, radiaciones ionizantes y carcinógenos (Subbaramaiah *et al.*,

1996; Jang *et al.*, 2000). En este estudio no se encontraron diferencias en la expresión de la ciclooxigenasa 1 en los ensayos realizados mediante PCR a tiempo real entre los distintos grupos de muestras ( $p=0,95$ ).



**Figura IX.2.3.** Las ciclooxigenasas 1 y 2 transforman el ácido araquidónico en prostaglandina H2 (PGH2) que a su vez es convertida en tromboxano A2 (TXA2), prostaglandina I2 (PGI2), prostaglandina D2 (PGD2), prostaglandina F2 (PGF2) y prostaglandina E2 (PGE2).

Las dos enzimas intervienen en varios procesos fisiológicos y patológicos. Se ha encontrado asociación entre una mayor expresión de COX-2 con cambios malignos en gran variedad de cánceres humanos, incluido el cáncer de mama (Singh *et al.*, 2002). Además inhibidores selectivos de COX-2 como el celecoxib y nimesulide retrasan la aparición del tumor y reducen la incidencia, multiplicidad y volumen tumoral (Harris *et al.*, 2000; Nakatsugi *et al.*, 2000). También se ha asociado la elevada expresión de COX-2 con un mayor tamaño tumoral, grado de malignidad histológico elevado, condición negativa para receptores hormonales, alta tasa de proliferación (identificada mediante Ki-67), alta expresión de p53, amplificación del oncogen *erbB-2*, metástasis en nódulos linfáticos axilares y diagnóstico histopatológico correspondiente a carcinomas ductales (Singh *et al.*, 2002). Sin embargo los diferentes estudios epidemiológicos que evalúan la relación entre la aparición de cáncer de mama y el consumo de antiinflamatorios no esteroideos sugieren que solo algunos subgrupos de cánceres mamarios sobre-expresan COX-2. En un estudio realizado por Subbaramaiah *et al.* en 1994, detectaron grandes cantidades de la enzima COX-2 en 14 de las 15 muestras de tumores mamarios que sobre-expresaban a su vez

erbB-2, en contraste con las 4 muestras con gran expresión de COX-2 de 14 erbB-2 negativas. Otro subgrupo de tumores mamarios que sobre-expresan COX-2 son aquellos que presentan mutaciones en el gen ras (Gillhooly *et al.*, 1999). Se han asociado en líneas celulares negativas para el RE  $\alpha$  niveles elevados de COX-2 con mutaciones en ras, y aumentos de COX-2 con la no dependencia estrogénica de células mamarias (Witton *et al.*, 2004). Otro estudio muestra que el 56% de los carcinomas mamarios infiltrativos expresa altos niveles de COX-2, mientras que tejidos mamarios benignos situados a 1 cm de estas lesiones malignas no expresan COX-2 (Soslow *et al.*, 2000). Liu y Rose encontraron que COX-2 se encuentra sobre-expresado en células de cánceres mamarios muy invasivos, mientras que células poco metastáticas no expresaban COX-2 (Liu *et al.*, 1996). En todos estos estudios la sobre-expresión de COX-2 está relacionada con características de peor pronóstico y tipos histológicos malignos de cáncer mamario. De acuerdo con estos estudios encontramos un aumento significativo de la expresión de COX-2 ( $p=0,004$ ) en muestras de CI comparando con carcinomas no CI y tejido mamario sano. Además un estudio reciente realizado por el grupo de Lerebours *et al.* documenta la sobre-expresión de COX2 en el CI humano frente a otros carcinomas no CI y tejido metastático que utilizan como controles (Lerebours *et al.*, 2008).

La sobre-expresión de COX-2 se produce por dos caminos, la baja regulación de su transcripción y la estabilización del ARN mensajero (Subbaramaiah *et al.*, 1996; Jang *et al.*, 2000). Múltiples señales vía sitios de unión para distintos factores de transcripción pueden inducir la transcripción de COX-2 (Appleby *et al.*, 1994). El ARNm de COX-2 no es estable debido a la presencia de 116 nucleótidos elementos de secuencia ricos en AU (116-nucleotide AU-rich sequence element (ARE)) localizados en la región 3' no traducida. Interacciones de las proteínas de unión a ARE con estas regiones facilitan la degradación del ARN mensajero e inhiben su traducción (Dixon *et al.*, 2000; Cok *et al.*, 2001).

En cánceres de mama humanos COX-2 se encuentra expresado frecuentemente en células del carcinoma mamario y tejido epitelial adyacente (Witton *et al.*, 2004). COX-2 también se expresa en tumores mamarios caninos, con una expresión de moderada a alta en el 18% de los adenocarcinomas analizados. La expresión inducida de COX-2 en esos tumores aumenta la síntesis de prostaglandinas (Doré *et al.*, 2003).

COX-2 es capaz de regular diversos procesos fisiológicos regulando el aumento de producción de prostaglandinas que son las que participan en proliferación celular, apoptosis, angiogénesis, invasividad celular y supresión inmune (Singh *et al.*, 2002). La prostaglandinas (PGs) son pequeñas moléculas secretadas por las células que las producen, y por ello son capaces de actuar sobre células vecinas. Este hecho se considera muy importante en el caso de las metástasis

cancerígenas (Hanahan *et al.*, 2000). Líneas celulares derivadas del cáncer mamario, particularmente aquellas con elevado potencial metastático, muestran incrementos en la producción de COX-2 y PGs (Howe *et al.*, 2001). Además COX-2 aumenta la habilidad de células cancerígenas para invadir el tejido adyacente. Los cambios en la capacidad de invasión son debidos a un aumento en la producción de las enzimas capaces de digerir la membrana basal (Singh *et al.*, 2002).

Varios estudios realizados *in vitro* e *in vivo* en modelos animales evidencian que inhibidores de COX-2 inhiben la angiogénesis tumoral. La sobre-expresión de COX-2 es observada en la neovascularización de varios tumores humanos, que incluyen tumores mamarios (Masferrer *et al.*, 2000).

## 2.6 Factores de transcripción

### 2.6.1 Genes *c-FOS* y *c-JUN*

Un estudio realizado por Bieche *et al.* en 2004, en el que compararon muestras de CI humano con otras correspondientes a otros tumores mamarios localmente avanzados mediante PCR a tiempo real, encontró sobre-expresión de 4 genes componentes de la familia del factor de transcripción AP-1 (jun, junB, fos y fosB).

La familia jun está formada por los genes c-jun, junB y junD, y la familia fos incluye a los genes c-fos, fosB, fosL1 y fosL2 (Lewin *et al.*, 1991). La expresión de los genes c-jun y c-fos es consecuencia de la señal mitogénica que comienza en la membrana plasmática tras la unión de los factores de crecimiento a sus receptores con actividad tirosina quinasa y que llega al núcleo por activación y translocación de serina/treonina quinasas (MAPK, ERK-1...) (Karin *et al.*, 1997).

Ambos genes tienen en sus promotores elementos de regulación por AP-1, que es un factor de transcripción que está constituido, entre otras proteínas, por las proteínas c-Jun y c-Fos. Por lo tanto estos genes tienen la capacidad de autoregularse. Además la actividad de las proteínas c-Jun y c-Fos se regulan por su propia expresión (Caelles, 2000).

Los genes de estas dos familias controlan la respuesta proliferativa de un modo primario, activando o inhibiendo la cascada de genes cuyos productos ponen en marcha o paran el ciclo celular. Además AP-1 regula genes implicados directamente en la aparición y progresión tumoral, como distintos oncogenes y genes supresores de tumores. AP-1 es activado por factores de crecimiento y diversos agentes de estrés celular, mediando la acción de oncogenes receptores tirosina quinasa de membrana y de la cadena de transmisión de la señal mitogénica (Caelles, 2000).

Nuestros análisis de expresión realizados mediante *pools* muestran la sobre-expresión de c-fos en los carcinoma no CI, mientras que no se han encontrado diferencias significativas respecto a c-jun entre las distintas muestras estudiadas. Sin embargo estos resultados no han sido confirmados mediante análisis estadísticos.

### 2.6.2 *PIK3R1*

La activación de PI 3-quinasa es necesaria y en algunos casos suficiente para iniciar algunas rutas de señalización estimuladas por insulina/IGF-I, lo que parece sugerir que la proteína PI 3-quinasa es la cabeza de una cascada de transducción de señales (Andjelkovic *et al.*, 1997). En el CI canino no parece que esta sea una ruta transcendente en su desarrollo y fenotipo característico ya que no se ha observado un cambio en la expresión del gen *PIK3R1* mediante técnicas de PCR a tiempo real. Sin embargo en los carcinomas distintos del CI sí existe una “tendencia” (significación no comprobada) a una mayor expresión, lo que indicaría un proceso distinto de señalización en el CI con respecto a otros carcinomas mamarios.

### 2.6.3 *MYC*

La proteína celular c-Myc induce la transformación celular, la proliferación y la apoptosis. En la especie humana se han encontrado expresión y/o sobre-expresión de c-myc en distintas neoplasias como en cáncer mamario, de estómago, de colon, etc, que en algunos casos se asocian con el grado de malignidad (Prins *et al.*, 1993; Hirvonen *et al.*, 1994). Sin embargo en nuestros análisis de expresión en el CI canino, aunque sí se expresa, no encontramos sobre-expresión de c-myc frente al resto de los grupos de muestras.

C-myc se expresa en células que proliferan, pero muy poco o nada en células quiescentes o diferenciadas terminalmente. Su sobre-expresión inhibe la diferenciación y favorece la proliferación celular. La causa principal de la activación oncogénica de c-myc parece ser la desregulación de su expresión, aunque el descubrimiento de alteraciones en la secuencia de las proteínas c-Myc expresadas en tumores no permite descartar la existencia de mutaciones activantes (Gardiner *et al.*, 1991).

C-Myc también puede inducir apoptosis cuando existen señales opuestas que bloquean la división celular (Hoffman *et al.*, 1998).

C-Myc se une al ADN y actúa como factor de transcripción, conjuntamente con otra proteína denominada Max formando un heterodímero. Max a su vez también puede formar homodímeros o heterodímeros con proteínas de la familia Mad y unirse a las mismas secuencias

de ADN, por lo que la regulación de los genes a los que se une c-Myc debe ser el resultado integrado de los niveles e interacción de todas estas proteínas (Bouchard *et al.*, 1998).

Entre los genes diana que regula c-Myc se encuentran la protimosina  $\alpha$ , ornitina descarboxilasa, telomerasa, RCC1, CDC25A, p53, eIF4E y CAD. Por el contrario parece que c-Myc inhibe la expresión de C/EBPa, la transferasa terminal, la albúmina, NCAM, trombospondina-1 y metalotioneína 1 (Caelles, 2000).

Como se ha comentado anteriormente nuestros resultados muestran la sobre-expresión del gen THBS1 que codifica la proteína trombospondina-1 en el CI y en carcinomas distintos al CI, de manera que la expresión basal de c-myc en nuestras muestras tumorales junto con los datos de expresión de THBS1 indican que c-myc no está inhibiendo la expresión de la proteína trombospondina-1.

## 2.7 Genes asociados con cáncer de mama

### 2.7.1 *erbB-2*

Un estudio realizado por Matsuyama *et al.* en 2001 demostró que c-erbB juega un papel importante en la carcinogénesis de la glándula mamaria canina, observando que c-erbB no se expresa en glándulas mamarias normales mientras que sí es expresado en tumores mamarios benignos y malignos, no habiendo asociación entre el tipo de receptor expresado (c-erbB1, c-erbB-2, c-erbB3, c-erbB4) y tipo histopatológico de tumor (Matsuyama *et al.*, 2001).

El erbB-2 codifica para una proteína de 185 kDa, que es una glicoproteína de membrana con dominios intra y extracelulares. Tiene actividad tirosina quinasa, y es homólogo del receptor del factor de crecimiento epidérmico. Se ha observado que la sobre-expresión de la proteína erbB-2 puede transformar diversas líneas celulares. También que animales transgénicos que sobre-expresan esta proteína desarrollan con frecuencia adenocarcinomas mamarios (Arteaga *et al.*, 1994).

Hay numerosos estudios que relacionan la frecuencia de sobre-expresión de erbB-2 con la aparición de cáncer mamario. Se ha visto expresión del gen en un 20-40% de los tumores mamarios invasivos y en más de un 50% de los adenocarcinomas *in situ*. También se ha asociado el nivel sérico de la proteína con la presencia de metástasis y con la resistencia al tratamiento quimioterápico (Arteaga *et al.*, 1994).

En el caso de la especie canina su expresión en el cáncer mamario está asociada con una rápida progresión y mal pronóstico (Murua Escobar *et al.*, 2001). Nosotros hemos estudiado la expresión de erbB-2 en el CI canino mediante la técnica de PCR a tiempo real, encontrando la



inhibición de su expresión en esta patología mamaria ( $p=0,04$ ), tanto en el análisis realizado con *pools* como con las muestras individuales. Otros autores han estudiado la expresión de erbB-2 en el CI de otras especies y modelos animales. En ratones xenotransplantados con CI observaron que las líneas de ratones MARY-X no expresan erbB-2 (Alpaugh *et al.*, 1999), a diferencia de los ratones WIBC-9 que sí expresan erbB-2 (Shirakawa *et al.*, 2001). Prost *et al.* en 1994 estudiaron la expresión de erbB-2 en la especie humana mediante southern blotting y encontraron que un 39% de 96 muestras con CI expresaban erbB-2, frente al 18% de 224 muestras de otros tumores mamarios. Otros estudios en la especie humana realizados por Guerin *et al.* también mediante la técnica de northern blotting observaron que esta expresión del ARNm del gen erbB-2 además es mayor en CI que en otros tumores mamarios. Sin embargo estudios anteriores al nuestro realizados en la especie humana mediante la técnica de PCR a tiempo real encuentran sobreexpresión del gen erbB-2 en el 36% de los CI estudiados frente al 26% de otros tumores mamarios analizados (Turpin *et al.*, 2002).

### 2.7.2 WISP3

Este gen fue denominado en 1999 por van Golen *et al.* “Lost in Inflammatory Breast Cancer gene” o LIBC. Este grupo utilizando técnicas de hibridación *in situ* encontraron que LIBC (actualmente llamado WISP3), estaba menos expresado en el CI que en otros tumores mamarios de grado histológico de malignidad III en la especie humana (van Golen *et al.*, 1999, 2000). Sin embargo estudios realizados por Bieche *et al.* en 2004 también en la especie humana no encontraron diferencias de expresión para el gen WISP3 entre muestras de CI y otros tumores mamarios. Nuestros resultados aunque realizados en la especie canina concuerdan con los obtenidos por Bieche *et al.*, ya que no se han observado diferencias de expresión para WISP3 entre las distintas muestras ni en el estudio de *pools* ( $p=0,42$ ), ni en el estudio individual de muestras ( $p=0,35$ ).

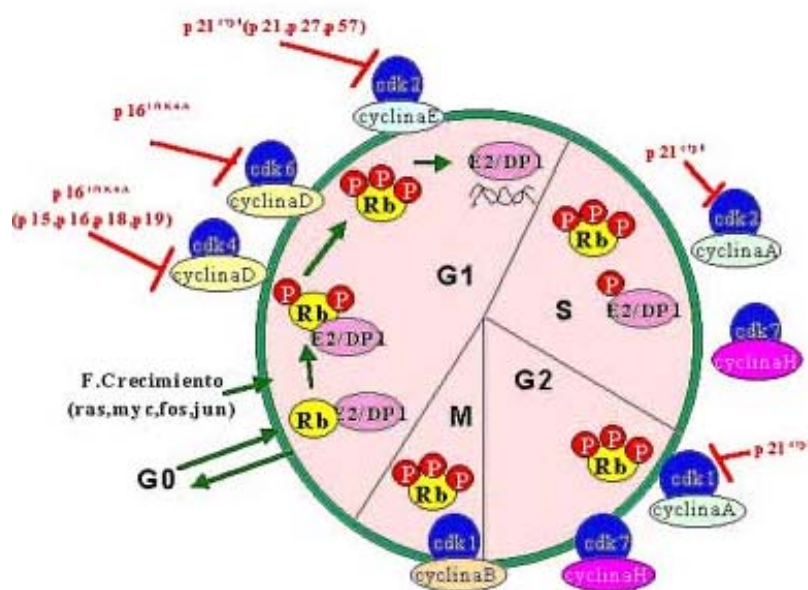
### 2.7.3 CDKN1A

Este gen codifica un potente inhibidor de la ciclina dependiente de quinasas. La proteína codificada por CDKN1A se une e inhibe la actividad de los complejos CDK2 y CDK4, funcionando así como regulador de la progresión del ciclo celular en G1 (Figura IX.2.4).

La expresión de este gen está estrechamente controlada por la proteína supresora de tumores p53, quien a través de la proteína codificada por CDKN1A media el arresto de la fase G1 del ciclo celular p53 dependiente en respuesta de variedad de estímulos a estrés. Además la

proteína puede interactuar con el antígeno nuclear de proliferación (PCNA), ejerciendo un papel en la regulación de la duplicación del ADN en la fase S del ciclo celular y en la reparación del daño del ADN.

En el estudio de expresión que realizamos de CDKN1A en la especie canina con 4 *pools* diferentes dentro del mismo grupo de animales no se encontró una expresión diferencial entre los distintos tipos de muestras ( $p=0,88$ ), de manera que no parece que este gen tenga un papel importante en el desarrollo y progresión del CI.



**Figura IX.2.4.** Esquema del ciclo celular y de las distintas ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas que intervienen.



## ***X. CONCLUSIONES***



## **X. CONCLUSIONES**

Como conclusión a este trabajo, destacamos los puntos más relevantes que implican a rutas metabólicas que podrían estar participando en el desarrollo y progresión del CI:

- 1) Los resultados de expresión obtenidos para los distintos genes candidatos implicados en rutas hormonales, conjuntamente con la expresión del gen CAV1 encontrado mediante la técnica de Differential Display, que media el tráfico vesicular de colesterol, nos permite emitir la hipótesis según la cual distintas hormonas, podrían estar depositándose en forma de gotas lipídicas y actuando como reservorio en el CI, ya que una proporción de CI caninos han sido descritos histológicamente como carcinomas ricos en lípidos.
- 2) La expresión diferente en el CI de determinados genes implicados en el proceso de angiogénesis, junto con hallazgos previos de la presencia de unas estructuras tumorales semejantes morfológicamente a capilares linfáticos, que actualmente se identifican como posible “Vascular Mimicry”, nos hace pensar en rutas metabólicas alternativas a la angiogénesis por las cuales el CI podría crecer, proliferar y metastatizar.
- 3) El aumento significativo de la expresión de COX-2 en el CI es un signo de extrema malignidad al ser un gen que participa procesos de proliferación celular, apoptosis, angiogénesis, invasividad celular y supresión inmune.
- 4) La técnica de DD nos ha permitido identificar los genes PHF14 y TTC3 que podrían participar en el sistema ubiquitina-proteosoma, cuya inhibición en el CI soporta la hipótesis de un peor funcionamiento del proceso de proteólisis en el tejido afectado por el CI, ya que estaría disminuyendo la degradación de proteínas mediada por el sistema ubiquitina-proteosoma.
- 5) La técnica de DD ha permitido observar patrones de expresión distintos entre muestras de CI, carcinomas no CI y tejido mamario no patológico, identificándose genes cuya función *in vivo* es hasta el momento desconocida, como el que hemos denominado banda 1 y cuya participación en el CI necesita esclarecerse.



## ***XI. BIBLIOGRAFÍA***





## ***XI. BIBLIOGRAFÍA***

- Aas T, Borresen AL, Geisler S, Smith-Sorensen B, Johnsen H, Varhaug JE, Akslen LA, Lonning PE.** (1996). Specific P53 mutations are associated with de novo resistance to doxorubicin in breast cancer patients. *Nat Med* 2: 811-814.
- Achen M, Jeltsch M, Kukk E, Makinen T, Vitali A, Wilks A, Alitalo K, Stacker S.** (1998). Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flt 1) and VEGF receptor 3 (Flt 4). *Proc Natl Acad Sci USA* 95:548-553.
- Achen MG, Stacker SA.** (2006). Tumor lymphangiogenesis and metastatic spread: new players begin to emerge. *Int J Cancer* 119: 1755-1760.
- Adams MD, Kelley JM, Gocayne JD, Dubnick M, Polymeropoulos MH, Xiao H, Merrill CR, Wu A, Olde B, Moreno RF.** (1991). Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science* Jun 21; 252(5013): 1651-6.
- Adams RH, Alitalo K.** (2007). Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* Jun; 8 (6): 464-478.
- Agrawal BL, Amaresh NR, Glynn TP.** (2003). Case 3: simultaneous and synchronous bilateral inflammatory breast cancer, *JCO* 21(11): 2215-.
- AJCC,** in: *AJCC Cancer Staging Handbook*, eds, Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz AG, Balch CM, Haller D, Morrow M., Springer: New York, 2002, pp. 255-281.
- Allen SW, Prasse KW, Mahaffey EA.** (1986). Cytologic differentiation of benign from malignant canine mammary tumors. *Vet Pathol* 23: 649-655.
- Allen SW, Mahaffey EA.** (1989). Canine mammary neoplasia: Prognostic indicators and response to surgery. *J Am Anim Hosp Assoc* 25:540-547.
- Al-Mowallad A, Kirwan C, Byrne G, McDowell G, Li C, Stewart A, Al-Qouzi A, Kumar S.** (2007). Vascular endothelial growth factor-C in patients with breast cancer. *In vivo* 21(3):549-51.
- Alonso D, Farina H, Skilton G, Gabri M, De Lorenzo M, Gomez D.** (1998). Reduction of mouse mammary tumor formation and metastasis by lovastatin, an inhibitor of mevalonate pathway of cholesterol synthesis. *Breast Cancer Research and Treatment* 50: 83-93.
- Alonso DF, Skilton G, Farias EF, Bal de Kier Joffe E, Gomez D.** (1999). Antimetastatic effect of desmopressin in a mouse mammary tumor model. *Breast Cancer Res Treat* 57: 271-275.
- Alpaugh ML, Tomlinson JS, Shao ZM, Barsky SH.** (1999). A novel human xenograft model of inflammatory breast cancer. *Cancer Res* 59: 5079-5084.
- Alpaugh ML, Tomlinson JS, Kasraeian S, Barsky SH.** (2002). Cooperative role of E-cadherin and sialyl-Lewis X/A-deficient MUC1 in the passive dissemination of tumor emboli in inflammatory breast carcinoma. *Oncogene* 21: 3631-3643.

- Anderson WF, Chu KC, Chang S.** (2003). Inflammatory breast carcinoma and noninflammatory locally advanced breast carcinoma: distinct clinicopathologic entities? *J Clin Oncol* 21: 2254-2259.
- Anderson WF, Schairer C, Cheng BE, Hance KW, Levine PH.** (2005,2006). Epidemiology of Inflammatory Breast Cancer. *Breast Disease* 22: 9-23.
- Andjelkovic M, Alessi DR, Meejer R, Fernandez A, Lambb NJC, Freech M, Cron P, Lucocq JM, Hemmings BA.** (1997). Role of trnalocation in the activation and function of protein kinase B. *J Biol Chem* 272: 31515-24.
- Appleby SB, Ristimaki A, Neilson K, Karko K, Hla T.** (1994). Structure of the human cyclooxygenase-2 gene. *Biochem J* 302: 723.
- Argyle DJ, Nasir L.** (2003). Telomerase: a potential diagnostic and therapeutic tool in canine oncology. *Vet Pathol* 40: 1-7.
- Arteaga C, Winnier A, Poirier M, Lopez-Arraza D, Shawver L, Hurd S, Stewart S.** (1994) p185c-erbB-2 signal enhances cisplatin-induced cytotoxicity in human breast carcinoma cells: association between an oncogenis receptor tyrosine kinase and drug-induced DNA repair. *Cancer Res* 54: 3758-3765.
- Arthur DW, Schmidt-Ullrich RK, Friedman RB.** (1999). Accelerated superfractionated radiotherapy for inflammatory breast carcinoma: complete response predicts outcome and allows for breast conservation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 44: 289-296.
- Arun B, Slack R, Gehan E, Spitzer T, Meehan KR.** (1999). Survival after autologous hematopoietic stem cell transplantation for patients with inflammatory breast carcinoma. *Cancer* 85: 93-99.
- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM.** (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275: 964-967.
- Atlan D, Chevallier B, Sheng RG.** (1995). Tamoxifen for the treatment of metastatic inflammatory breast carcinoma. *Am J Clin Oncol* 18: 74-77.
- Aziz SA, Pervez S, Khan S, Kayani N, Azam SI, Rahbar MH.** (2001). Case control study of prognostic markers and disease outcome in inflammatory carcinoma breast: a unique clinical experience. *Breast J* 7: 398-404.
- Baker EA, Stephenson TJ, Reed MWR, Brown NJ.** (2002). Expression of proteinases and inhibitors in human breast cancer progression and survival. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 55: 300-304.
- Bakker HJ, Planken PC, Kuipers L, Lagendijk A.** (1990). Phase modulation in second-order nonlinear-optical processes. *Phys Rev A* 1; 42(7): 4085-4101.
- Banerji S, Ni J, Wang S-X.** (1999). LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *J Cell Biol* 144: 789-801.

- Banks JW.** (1986). Histología veterinaria aplicada. Manual moderno.
- Baldwin ME et al.** (2005). Vascular endothelial growth factor D is dispensable for development of the lymphatic system. *Mol Cell Biol* 25: 2441–2449.
- Barber K, Dockerty M, Clagett O.** (1961). Inflammatory carcinoma of the breast. *Surg Gynecol Obstet* 122: 406-410.
- Barker J, Montague E, Peters L, et al.** (1980). Clinical experience with irradiation of inflammatory carcinoma of the breast with and without elective chemotherapy. *Cancer* 45: 625-629.
- Bassam BJ, Caetano-Anollés G, Gresshoff PM.** (1991). Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels: *Anal Biochem* Jul 196(1); 80-83.
- Battistacci M, Calandra ML.** (1974). Quantitative measurement of metabolites of the tryptophane-niacin pathway in healthy bitches and those affected with mammary dysplasia and neoplasia. *Nuova Vet.* 50: 246-252.
- Beahrs O, Henson D, Hutter R et al** (eds). Manual for Staging of Cancer, (ed 3). Philadelphia, PA, Lippincott, 1988, pp 145-150.
- Beasley NJP, Prevo R, Banerji S.** (2002). Intratumoral lymphangiogenesis and lymph node metastasis in head and neck cancer. *Cancer Res* 62:1315–1320.
- Bell C.** (1814). A System of Operative Surgery, vol 2. Hartford, CT, Hale and Hosmer, p136.
- Berger S.** (1962). Inflammatory carcinoma of the breast. *Radiology* 88: 1109-1116.
- Bertin N, Clezardin P, Kubiak R, Frappart L.** (1997). Thrombospondin-1 and –2 messenger RNA expression in normal, benign, and neoplastic human breast tissues: correlation with prognostic factors, tumor angiogenesis, and fibroblastic desmoplasia. *Cancer Res* 57: 396–399.
- Bertucci F, Tarpin C, Charafe-Jauffret E, Bardou VJ, Braud AC, Tallet A, Gravis G, Viret F, Goncalves A, Houvenaeghel G.** (2004). Multivariate analysis of survival in inflammatory breast cancer: impact of intensity of chemotherapy in multimodality treatment. *Bone Marrow Transplant* 33: 913-920.
- Bertucci F, Finetti P, Rougemont J.** (2005). Gene expression profiling identifies molecular sub-types of inflammatory breast cancer. *Cancer Res* 65(6): 2170–2178.
- Bieche I, Lerebours F, Tozlu S, Espie M, Marty M, Lidereau R.** (2004). Molecular profiling of inflammatory breast cancer: identification of a poor-prognosis gene expression signature. *Clin Cancer Res* 10: 6789-6795.
- Bird C, DeInnocentes P, Lynn. K.** (2002). Focused Expression Profiling of Cyclin and Cyclin-Dependent Kinase Integration Complex Components and Regulators in a Spontaneous Model of Canine Mammary Cancer. In: Modiano J. F. (Ed.) International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org) P0410.0902.

- Birkedal-Hansen H, Moore WGI, Bodden MK.** (1993). Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 4: 197–250.
- Birrell SN, Hall RE, Tilley WD.** (1998). Role of the androgen receptor in human breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplas* 3: 95-103.
- Bland KI, Copeland EM,** (1991) 3d eds., The breast: comprehensive management of benign and malignant diseases, Philadelphia: Saunders.
- Blankenstein MA, van de Ven J, Maitimu-Smeele I, Donker GH, de Jong PC, Daroszewski J, Szymczak J, Milewicz A, Thijseen JH.** (1999). Intratumoral levels of estrogens in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 69: 293-297.
- Blood CH, Zetter BR.** (1990). Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis. *Acta Bioch Bioph* 1032: 89-93.
- Bono P, Wasenius V-M, Heikkilä P, Lundin J, Jackson DG, Joensuu H.** (2004). High LYVE-1–Positive Lymphatic Vessel Numbers Are Associated with Poor Outcome in Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 10: 7144-.
- Borresen AL, Andersen TI, Tretli S, Heiberg A, Moller P.** (1990). Breast cancer and others cancers in Norwegian families with ataxia-telangiectasia. *Genes Chromosomes Cancer* 2: 339-340.
- Bouchard C, Staller, Eilers M.** (1998). Control of cell proliferation by Myc. *Trends Cell Biol* 8: 202-206.
- Bozzetti F, Saccozzi R, DeLena M.** (1981). Inflammatory cancer of the breast; Analysis of 114 cases. *J Surg Oncol* 18 355–361.
- Bristol IJ, Buchholz TA.** (2005, 2006). Inflammatory breast cancer: current concepts in local management. *Breast Disease* 22: 75-83.
- Bryant T.** Diseases of the breast. London, England, Cassell & Co Ltd, 1887, pp 171-194.
- Brodey RS, Fidler IJ, Howson AE.** (1966). The relationship of estrous irregularity, pseudopregnancy and pregnancy to the development of canine mammary neoplasms. *J Am Vet Med Assoc* 149: 1047-1049.
- Brodey RS, Goldschmidt MA, Roszel JR.** (1983). Canine mammary gland neoplasms. *J Am Anim Hosp Assoc* 19: 61-90.
- Brody RS, Goldschmidt MH, Roszel JR.** (1985). Canine mammary gland neoplasia. *J Am Anim Hosp Assoc* 19: 61-90.
- Brooks HL, Mandava N, Pizzi WF, Shah S.** (1998). Inflammatory breast carcinoma: a community hospital experience. *J Am Coll Surg* 186: 622-629.
- Brown EJ, Frazier WA.** (2001). Integrin associated protein (CD47) and its ligands. *Trends Cell Biol.* 11: 130–135.

**Brunetti B, Sarli G, Preziosi R, Leprotti S, Benazzi C.** (2003). E-cadherin expression in canine mammary carcinomas with regional lymph node metastases. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 50(10): 496-500.

**Busch U, Rudolph R.** (1995). Mammary carcinoma of the female dog: clinical relevance of the immunohistochemical demonstration of micrometastases in the regional lymph nodes. *Tierarztl Prax.* 23(3): 280-286.

**Bustin SA.** (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25: 169-193.

**Buzdar AU, Singletary SE, Booser DJ, Frye DK, Wasaff B, Hortobagyi GN.** (1995). Combined modality treatment of stage III and inflammatory breast cancer. M.D. Anderson Cancer Center experience. *Surg Oncol Clin N Am* 4: 715-734.

**Caelles C, Muñoz A.** Carcinogénesis humana. VI Simposium sobre oncogenes y cáncer. Madrid 10 y 11 de Mayo 2000.

**Campbell SC, Volpert OV, Ivanovich M, et al.** (1998). Molecular mediators of angiogenesis in bladder cancer. *Cancer Res* 58: 1298-304.

**Carreira CM, Nasser SM, di Tomaso E.** (2001). LYVE-1 is not restricted to the lymph vessels: expression in normal liver blood sinusoids and down-regulation in human liver cancer and cirrhosis. *Cancer Res* 61: 8079-8084.

**Carsons S, Lavietes BB, Diamond HS, Kinney SG.** (1985). The immunoreactivity, ligand, and cell binding characteristics of rheumatoid synovial fluid fibronectin. *Arthritis Rheum* 28: 601-612.

**Carter P, Presta L, Gorman CM.** (1992). Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 4285-4289.

**Casciato D, Lowitz B.** (2001). Oncología clínica. 4ta ed. Marban (Ed). Madrid. España. 3-28.

**Castellani P, Viale G, Dorcaratto A, Nicolo G, Kaczmarek J, Querze G, Zardi L.** (1994). The fibronectin isoform containing the ED-B oncofetal domain: a marker of angiogenesis. *Int J Cancer* 59: 612-618.

**Castillo R, Maragall A, Rodes J, Clement C, Profitos J, Ordinas A.** (1977). Increased factor VIII complex and defective ristocetin-induced platelet aggregation in liver disease. *Thromb Res* 11: 899-906.

**Chandrasekaran S, Guo NH, Rodrigues RG, Kaiser J, Roberts DD.** (1999). Pro-adhesive and chemotactic activities of thrombospondin-1 for breast carcinoma cells are mediated by  $\alpha 3 \beta 1$  integrin and regulated by insulin-like growth factor-1 and CD98. *J Biol Chem* 274: 11408-11416.

**Chang S, Parker SL, Pham T, Buzdar AU, Hursting SD.** (1998). Inflammatory breast carcinoma incidence and survival: the surveillance, epidemiology, and end results program of the National Cancer Institute, 1975-1992. *Cancer* 82: 2366-2372.

**Chang S, Buzdar AU, Hursting SD.** (1998). Inflammatory breast cancer and body mass index. *J Clin Oncol* 16: 3731–3735.

**Charafe-Jauffret E, Tarpin C, Bardou VJ, Bertucci F, Ginestier C, Braud AC, Puig B, Geneix J, Hassoun J, Birnbaum D,** et al. (2004). Immunophenotypic analysis of inflammatory breast cancers: identification of an ‘inflammatory signature’. *J Pathol* 202: 265–273.

**Charpin C, Bonnier P, Kkouzami A, Vacheret H, Andrac L, Lavaut MN, Allasia C, Piana L.** (1992). Inflammatory breast carcinoma: an immunohistochemical study using monoclonal anti-pHER-2/neu, pS2, cathepsin, ER and PR. *Anticancer Res* 12: 591–597.

**Charpin C, Dales JP, Garcia S, Carpentier S, Djemli A, Andrac L, Lavaunt MN, Allasia C, Bonnier P.** (2004). Tumor neoangiogenesis by CD31 and CD105 expression evaluation in breast carcinoma tissue microarrays. *Clin Cancer Res* 10(17): 5815–9.

**Chevallier B, Asselain B, Kunlin A, Veyret C, Bastit P, Graic Y.** (1987). Inflammatory breast cancer. Determination of prognostic factors by univariate and multivariate analysis. *Cancer* 60: 897–902.

**Chevallier B, Roche H, Olivier JP, Chollet P, Hurteloup P.** (1993). Inflammatory breast cancer. Pilot study of intensive induction chemotherapy (FEC-HD) results in a high histologic response rate. *Am J Clin Oncol* 16: 223–228.

**Chiedozi LC.** (1987). Rapidly progressing breast cancer in Nigeria. *Eur J Surg Oncol* 13: 505–509.

**Choi YK, Hong SH, Kim BH, Kim HC, Woo HJ, Kim DY.** (2004). Immunohistochemical expression of galectin-3 in canine mammary tumours. *J Comp Pathol* Aug-Oct; 131(2-3): 242–245.

**Chow CK.** (2005). Imaging in Inflammatory Breast Carcinoma. *Breast Disease* 22: 45–54.

**Chui X, Egami H, Yamashita J, Kurizaki T, Ohmachi H, Yamamoto S, Ogawa M.** (1996). Immunohistochemical expression of c-kit proto-oncogen product in human malignant and non-malignant breast tissues. *Br J Cancer* 73: 1233–1236.

**Clark JH.** (1994). Mechanism of action of steroid hormones and antagonists. En: Golldzierher, JW Fotherby, K (ed). *Pharmacology of the contraceptive steroids*. Raven Press, NY. 27–40.

**Claver JA, Sanchez A, Sicardi AJ, Lawzewitsch I.** (1995). Lecciones de histología veterinaria. Vol. 7. Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina. 59–76.

**Clezardin P, Frappart L, Clerget M,** et al. (1993). Expression of thrombospondin (TSP1) and its receptors (CD36 and CD51) in normal, hyperplastic, and neoplastic human breast. *Cancer Res* 53:1421–30.

**Cobleigh MA, Langmuir VK, Sledge GW.** (2003). A phase I/II dose-escalation trial of bevacizumab in previously treated metastatic breast cancer. *Semin Oncol* 30: 117–124.

**Cok SJ, Morrison AR.** (2001). The 3'-untranslated region of murine cyclooxygenase-2 contains multiple regulatory elements that alter message stability and translational efficiency. *J Biol Chem* 276: 23179.

**Colpaert CG, Vermeulen PB, Benoy I, Soubry A, van Roy F, van Beest P, Goovaerts G, Dirix LY, van Dam P, Fox SB, et al.** (2003). Inflammatory breast cancer shows angiogenesis with high endothelial proliferation rate and strong E-cadherin expression. *Br J Cancer* 88: 718-725.

**Concannon PW, Hansel W, Visek WJ.** (1975). The ovarian cycle of the bitch: plasma estrogen, LH and progesterone. *Biol Reprod* 13: 112-121.

**Corrada Y, Gobello C.** (2001). Acromegalia del diestro en la perra. *Analecta Veterinaria*. Vol 21 N° 1: 57-62.

**Corrada Y, Castex G, de la Sota L, Goya R, Gobello C.** (2002). Growth hormone serum concentrations in bitches with spontaneous mammary tumors before and after mastectomy. *Anales de Veterinaria de Murcia, España*. 19: 37-42.

**Cottam DW, Rees RC.** (1993). Regulation of matrix metalloproteinases: their role in tumour invasion and metastasis. *Int J Oncol* 2: 861-72.

**Conway EM, Collen D, Carmeliet P.** (2001). Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* 49: 507-521.

**Cristofanilli M, Buzdar AU, Hortobagyi GN.** (2003). Update on the management of inflammatory breast cancer. *Oncologist* 8: 141-148.

**Cueni LN, Detmar M.** (2006). New insights into the molecular control of the lymphatic vascular system and its role in disease. *J Invest Dermatol* 126: 2167-2177.

**Cunnick GH, Jiang WG, Gomez KF, Mansel RE.** (2001). Lymphangiogenesis quantification using quantitative PCR and breast cancer as a model. *Biochem Biophys Res Commun* 288(4): 1043-6.

**Dahme E, Weiss E.** (1989). Anatomía Patológica Especial Veterinaria. Acribia. Zaragoza. España. 289-291.

**Dales JP, Garcia S, Bonnier P, Duffaud F, Andrac-Meyer L, Ramuz O, Lavaunt MN, Allasia C, Charpin C.** (2003). CD105 expression is a marker of high metastatic risk and poor outcome in breast carcinomas. Correlations between immunohistochemical analysis and long-term follow-up in a series of 929 patients. *Am J Clin Pathol* 119: 374-80

**Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N.** (1994). Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation in thrombospondin. *Science* (Wash. DC) 265: 1582-1584.

**Dao TL, Hayes C, Libby CPR.** (1974). Steroid sulfatase activities in human breast tumors. *Proc Soc Exp Biol Med* 146: 381-384.



**D'Arville CN, Pierrepoint CG.** (1979). The demonstration of oestrogen, androgen and progestagen receptors in the cytosol fraction of canine mammary tumors. *Eur J Cancer*: 875-883.

**Dawson DW, Pearce SFA, Zhong R, Silverstein RL, Frazier WA, Bouck NP.** (1997). CD36 mediates the *in vitro* inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells. *J Cell Biol* 138: 707-717.

**Delabar JM, TheAophile D, Rahmani Z, Chettouh Z, Blouin JL, Prieur M, Noel B, Sinet PM.** (1993). Molecular mapping of 24 features of Down syndrome on chromosome 21. *Eur J Hum Genet* 1: 114-124.

**De Boer RH, Allum WH, Ebbs SR.** (2000). Multimodality therapy in inflammatory breast cancer: is there a place for surgery? *Ann Oncol* 11: 1147-1153.

**De la Hoya M.** Genes de susceptibilidad y cáncer de mama. VI Simposium sobre oncogenes y cáncer. Madrid 10 y 11 de Mayo de 2000.

**De Larue J, May-Levin F, Mouriesse H, et al.** (1981). Oestrogen and progesterone cytosolic receptors in clinically inflammatory tumours of the human breast. *Br J Cancer* 44: 911-916.

**Dellman HD, Brown ME.** Histología veterinaria. Acribia 1980.

**Denoix P.** The institut's contribution to the definition of factors guiding the choice of treatment: Phase I development, in Denoix P (ed): Treatment of Malignant Breast Tumors. Recent Results in Cancer Research, vol 32. Berlin, Germany, Springer-Verlag, 1970, pp 3-11.

**Dershaw DD, Moore MP, Liberman L.** (1994). Inflammatory breast carcinoma: mammographic findings. *Radiology* 190: 831-834.

**Dickson RB, Lippman ME.** (1995). Growth factors in breast cancer. *Endocr Rev* 16: 559-589.

**Dixon DA, Kaplan CD, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM.** (2000). Post-transcriptional control of cyclooxygenase-2 gene expression. The role of the 3'-untranslated region. *J Biol Chem* 275: 11750.

**Donnay I, Rauis J, Verstegen J.** (1994). Influence des antécédents hormonaux sur l'apparition clinique des tumeurs mammaires chez la chienne. Étude épidémiologique. *Ann Med Vet* 138: 109-117.

**Donegan W.** Staging and end results, in: Spratt JS Jr, Donegan WL (eds): Cancer of the Breast. Philadelphia, PA, Saunders 1967, pp 117-161.

**Dooley TP, Haldeman-Cahill R, Joiner J, Wilborn T.** (2000). Expression profiling of human sulfotransferase and sulfatase gene superfamilies in epithelial tissues and cultured cells. *Biochem Biophys Res Commun* 277: 236-245.

- Doré M, Lanthier I, Siriois J.** (2003). Cyclooxygenase-2 Expression in Canine Mammary Tumors. *Vet Pathol* 40: 207–212.
- Doss RP.** (1996). Differential display without radioactivity. A modified procedure. *Biotechniques* 21 (3): 408–10,412.
- Droulias C, Sewell C, McSweeney M, et al.** (1976). Inflammatory carcinoma of the breast: A correlation of clinical, radiologic and pathologic findings. *Ann Surg* 184: 217–222.
- Duffy MJ, Maguire TM, Hill A, McDermott E, O'Higgins N.** (2000). Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast Cancer Res* 2: 252–7.
- Dukes HH, Swenson MJ.** Fisiología de los animales domésticos. Aguilar 1977.
- Dumont DJ, Yamaguchi TP, Conlon RA, Rossant J, Breitman ML.** (1992). TEK, a novel tyrosine kinase gene located on mouse chromosome 4, is expressed in endothelial cells and their presumptive precursors. *Oncogene* 7: 1471–1480.
- Dunphy F, Spitzer G, Buzdar A, et al.** (1990). Treatment of estrogen receptor negative or hormonal refractory breast cancer with double high-dose chemotherapy intensification and bone marrow support. *J Clin Oncol* 8: 1207–1216.
- Edery M, Goussard J, Dehennin L, Scholler R, Reiffsteck J, Drosowsky MA.** (1981). Endogenous oestradiol-17b concentration in breast tumours determined by mass fragmentography and by radioimmunoassay: relationship to receptor content. *Eur J Cancer* 17: 115–120.
- Eifel P, et al.** (2001). National institutes of health consensus development conference statement: adjuvant therapy for breast cancer, November 1-3, 2000. *J Natl Cancer Inst* 93: 979–989.
- Ellis D, Teitelbaum S.** (1974). Inflammatory carcinoma of the breast: A pathologic definition. *Cancer* 33: 1045–1047.
- Elston CW, Ellis IO.** (1993). Method for grading breast cancer: *J Clin Pathol* 46: 189–190.
- Engelman JA, Lee RJ, Karnezis A, Bearss DJ, Webster M, Siegel P, Muller WJ, Windle JJ, Pestell RG, Lisanti MP.** (1998). Reciprocal regulation of Neu tyrosine kinase activity and caveolin-1 protein expression in vitro and in vivo. Implications for mammary tumorigenesis. *J Biol Chem* 273: 20448–20455.
- Engelman JA, Zhang XL, Galbiati F, Volonte D, Sotgia F, Pestell RG, Minetti C, Scherer PE, Okamoto T, Lisanti MP.** (1998). Molecular genetics of the caveolin gene family: implications for human cancers, diabetes, Alzheimer's disease, and muscular dystrophy. *Am J Hum Genet* 63:1578–1587.
- Engelman JA, Zhang XL, Lisanti MP.** (1999). Sequence and detailed organization of the human caveolin-1 and -2 genes located near the D7S522 locus (7q31.1). Methylation of a CpG island in the 5'promoter region of the caveolin-1 gene in human breast cancer cell lines. *FEBS Lett* 448: 221–230.

- Ennis BW, Matrisian LM.** (1994). Matrix degrading metalloproteinases. *J Neurooncol* 18: 105–98.
- Ettinger SJ, Feldman EC.** Tratado de medicina interna veterinaria. 4ta ed. Intermedica. 2053-2056, 1997.
- Ewing J.** Neoplastic Diseases a Treatise on Tumors, W.B. Saunders Company: Philadelphia, 523–583, 1934.
- Faille A, De Cremoux P, Extra JM, Linares G, Espie M, Boursstyn E, De Rocquancourt A, Giacchetti S, Marty M, Calvo F.** (1994). p53 mutations and overexpression in locally advanced breast cancers. *Br J Cancer* 69:1145-1150.
- Falette N, Paperin MP, Treilleux I, Gratadour AC, Peloux N, Mignotte H, Tooke N, Lofman E, Inganas M, Bremond A, Ozturk M, Puisieux A.** (1998). Prognostic value of p53 gene mutation in a large series of node-negative breast cancer patients. *Cancer Res* 58: 1451-1455.
- Feki A, Irminger-Finger I.** (2004). Mutational spectrum of p53 mutations in primary breast and ovarian tumors. *Crit Rev Oncol Hematol* 52: 103–116.
- Feldman LD, Hortobagyi GN, Buzdar AU, Ames FC, Blumenschein GR.** (1986). Pathological assessment of response to induction chemotherapy in breast cancer. *Cancer Res* 46: 2578- 2581.
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J.** (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nature Med* 9: 669–676.
- Ffrench-Constant C.** (1995). Alternative splicing of fibronectin: many different proteins but few different functions. *Exp Cell Res* 221: 261–271.
- Fiddler IJ.** (1978). Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. *Cancer Res* 38: 2651.
- Fidler I, Hart IR.** (1982). Biological diversity in metastasis neoplasms: origins and implications. *Science* 217: 998.
- Fidler IJ, Poste G.** (1985). The cellular heterogeneity of malignant neoplasms: implications for adjuvant chemotherapy. *Semin Oncol* Sep; 12(3): 207-221.
- Fiddler IJ.** (1990). Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth GHA Clowes memorial award lecture. *Cancer Res* 50: 6130.
- Fiddler IJ.** (1995). Modulation of the organ microenvironment for the treatment of cancer metastasis (editorial). *J Natl Cancer Inst* 84: 1588.
- Fields JN, Perez CA, Kuske RR.** (1989). Inflammatory carcinoma of the breast: treatment results on 107 patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 17: 249–255.

**Fleming RY, Asmar L, Buzdar AU, McNeese MD, Ames C, Ross MI, Singletary SE.** (1997). Effectiveness of mastectomy by response to induction chemotherapy for control in inflammatory breast carcinoma. *Ann Surg Oncol* 4: 452-461.

**Foda HD, Zucker S.** (2001). Matrix metalloproteinase in cancer invasion, metastasis and angiogenesis. *Drug Discovery Today* 6: 478-82.

**Fonsatti E, Del Vecchio L, Altomonte M.** (2001). Endoglin: an accessory component of the TGF-beta-binding receptor complex with diagnostic, prognostic, and bioimmunotherapeutic potential in human malignancies. *J Cell Physiol* 188: 1-7.

**Forde A, Constien R, Grone HJ, Hammerling G, Arnold B.** (2002). Temporal Cre-mediated recombination exclusively in endothelial cells using Tie2 regulatory elements. *Génesis* 33: 191-197.

**Forozan F, Veldman R, Ammerman CA, Parsa NZ, Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Ethier SP.** (1999). Molecular cytogenetic analysis of 11 new breast cancer cell lines. *Br J Cancer* 81: 1328-1334.

**Fox SB, Turner GD, Leek RD, Whitehouse RM, Gatter KC, Harris AL.** (1995). The prognostic value of quantitative angiogenesis in breast cancer and role of adhesion molecule expression in tumor endothelium. *Breast Cancer Res Treat* 36: 219-226.

**Frandsen DR.** Anatomía y fisiología de los animales domésticos. Interamericana-McGraw-Hill, 1988.

**Frank DW, Kirton KT, Murchism TE, Quintan WJ, Coleman TJ, Gilbertson TJ, Feenstra ES, Kimball FA.** (1979). Mammary tumors and serum hormones in the bitch treated with medroxyprogesterone acetate and progesterone for four years. *Fertil Steril* 31: 340-346.

**Frank PG, Cheung MW, Pavlides S, Llaverias G, Park DS, Lisanti MP.** (2006). Caveolin-1 and regulation of cellular cholesterol homeostasis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: 677-686.

**Frazier WA, Gao AG, Dimitry J, Chung J, Brown EJ, Lindberg FP, Linder ME.** (1999). The thrombospondin receptor integrin associated protein (CD47) functionally couples to heterotrimeric Gi. *J Biol Chem* 274: 8554-8560.

**Freyberg MA, Kaiser D, Graf R, Vischer P, Friedl P.** (2000). Integrin-associated protein and thrombospondin-1 as endothelial mechanosensitive death mediators. *Biochem Biophys Res Commun* 271: 584-588.

**Freyberg MA, Kaiser D, Graf R, Bottenbender J, Friedl P.** (2001). Proatherogenic flow conditions initiate endothelial apoptosis via thrombospondin-1 and the integrin-associated protein. *Biochem Biophys Res Commun* 286: 141-149.

**Fuberg AH. and Ambrosone CB.** (2001). Molecular epidemiology, biomarkers and cancer prevention. *Trends in Molec Med* 7: 517-521.

**Fukuda T, Yoshida N, Kataoka Y, Manabe R, Mizuno-Horikawa Y, Sato M, et al.** (2002). Mice lacking the EDB segment of fibronectin develop normally but exhibit reduced cell growth and fibronectin matrix assembly in vitro. *Cancer Res* 62(19): 5603–10.

**Funakoshi Y, Nakayama H, Uetsuka K, Nishimura R, Sasaki N, Dori K.** (2000). Cellular proliferative and telomerase activity in canine mammary gland tumors. *Vet Pathol* 37: 177-183.

**Futreal PA et al.** (2001). Cancer and genomics. *Nature* 409: 850–852.

**Futreal PA et al.** (2004). A census of human cancer genes. *Nature Rev Cancer* 4: 177–183.

**Gamallo C, Palacios J, Suarez A, Pizarro A, Navarro P, Quintanilla M, Cano A.** (1993). Correlation of E-cadherin expression with differentiation grade and histological type in breast carcinoma. *Am J Pathol* 142 : 987–993.

**Galbiati, F, Razani B, Lisanti M.P.** (2001). Emerging themes in lipid rafts and caveolae. *Cell* 106: 403–411.

**Gale NW, Thurston G, Hackett SF, Renard R, Wang Q, McClain J, Martin C, Witte C, Witte MH, Jackson D, Suri C, Campochiaro PA, Wiegand SJ, Yancopoulos GD.** (2002). Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by Angiopoietin-1. *Dev Cell* 3: 411–423.

**Gao AG, Lindberg FP, Dimitry JM, Brown EJ, Frazier WA.** (1996). Thrombospondin modulates  $\alpha v \beta 3$  function through integrin associated protein. *J Cell Biol* 135: 533–544.

**Garbett EA, Reed MW, Brown MJ.** (1999). Proteolysis in human breast and colorectal cancer. *Br J Cancer* 81: 287-293.

**Gardiner EM, Richman A, Hayday A.** (1991). Myc activation: a case of complex corruption. *Sem Virol* 2: 341-350.

**Gassic GJ, Gassic TB, Galanti N, Johnson T, Murphy S.** (1973). Platelet-tumor cell interactions in mice. The role of platelets in spread of malignant disease. *International Journal of Cancer* 11: 704-718.

**Gasparini G.** (1996). Angiogenesis research up to 1996: a commentary on the state of art and suggestions for future studies. *Eur J Cancer*. 14: 2379-2385.

**Gasparini G, Toi M, Biganzoli E, Dittadi R, Fanelli M, Morabito A, Boracchi P, Gion M.** (2001). Thrombospondin-1 and -2 in node-negative breast cancer: correlation with angiogenic factors, p53, cathepsin D, hormone receptors and prognosis. *Oncology* 60: 72–80.

**Gentle A, Anastopoulos F, McBrien NA.** (2001). High-resolution semi-quantitative real-time PCR without the use of a standard curve. *BioTechniques* 31: 502-508.

**Giannelli G, Erriquez R, Fransvea E, Daniele A, Trerotoli P, Schittulli F, Grano M, Quaranta M, Antonaci S.** (2004). Proteolytic imbalance is reversed after therapeutic surgery in breast cancer patients. *Int J Cancer* 109: 782–5.

**Gibson UE, Heid CA, Williams PM.** (1996). A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 6(10): 995-1001.

**Gilbertson SR, Kurzman ID, Zachrau RE, Hurvitz AI, Black MM.** (1983). Canine mammary epithelial neoplasm: Biologic implications of morphologic characteristics assess in 232 dogs. *Vet Pathol* 20: 127-142.

**Gilhooly EM, Rose DP.** (1999). The association between a mutated ras gene and cyclooxygenase-2 gene expression in human breast cancer cell lines. *Int J Oncol* 15: 267.

**Giordano SH.** (2003). Update of Locally Advanced Breast Cancer. *The Oncologist* 8: 521-530.

**Girma JP, Meyer D, Pannekock H, Verweij CL, Sixma JJ.** (1987). Structure-function relationship of human von Willebrand factor. *Blood* 70: 605-611.

**Giron S, Tejera AM, Ripoll GM, Gomez DE, Alonso DF.** (2002). Desmopressin inhibits lung and lymph node metastasis in a mouse mammary carcinoma model of surgical manipulation. *J Surg Oncol* 81: 38-44.

**Giustolise R, Musso R, Cacciola E, Cacciola RR, Russo M, Petrolito A.** (1984). Abnormal plasma level of factor VIII/von Willebrand factor complex in myocardial infarction: expression of acute phase reaction or index of vascular endothelium damage? *Thromb Haemost* 51: 408.

**Glenney JR Jr., Zokas L.** (1989). Novel tyrosine kinase substrates from Rous sarcoma virus-transformed cells are present in the membrane skeleton. *Cell Biol* 108: 2401-2408.

**Glenney JR, Jr.** (1989). Tyrosine phosphorylation of a 22-kDa protein is correlated with transformation by Rous sarcoma virus. *J Biol Chem* 264: 20163-21066.

**Gobello C, Corrada Y.** (2001). Canine mammary tumors: An endocrine clinical approach. *Comp Cont Educ Pract* 23: 705-710.

**Goebel M, Yanagida M.** (1991). The TPR snap helix: a novel protein repeat motif from mitosis to transcription. *Trends Biochem Sci* 16: 173-177.

**Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Senn HJ.** (1998). Meeting highlights: international consensus panel on the treatment of primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 90: 1601-1608.

**Goldstone SD, Lavin MF.** (1991). Isolation of a cDNA clone, encoding a human beta-galactoside binding protein, overexpressed during glucocorticoid-induced cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 31: 746-750.

**Gómez D, Alonso D, Yoshiji H, Thorgeirsson U.** (1997). Tissue inhibitors of metalloproteinases; structure, regulation and biological functions. *European Journal of Cell Biology* 74: 111-122.

**Gómez D, Alonso D.** (1998). Introducción a la Oncología Molecular. Universidad Nacional de Quilmes. Buenos Aires. Argentina. 113-134.

- Good DJ, Polverini PJ, Rastinejad F, Lebeau MM, Lemons RS, Frazier WA, Bouck NA.** (1990). Tumor suppressor dependent inhibitor of angiogenesis in immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 6624–6628.
- Gordon JL, Pottinger BE, Woo P, Rosenbaum J, Black CM.** (1987). Plasma von Willebrand factor antigen in connective tissue disease. *Annals of the Rheumatic Diseases* 46: 491-492.
- Gottschlich S, Goeroegh T, Folz B, Lippert BM, Werner JA.** (1997). Optimized differential display and reamplification parameters for silver staining. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 97: 237-240.
- Graham J, Myers R.** (1999). The prognostic significance of angiogenesis in canine mammary tumors. *J Vet Intern Med* 13(5): 416-418.
- Grant AJ, Goddard S, Ahmed-Choudhury J.** (2002). Hepatic expression of secondary lymphoid chemokine (CCL21) promotes the development of portal-associated lymphoid tissue in chronic inflammatory liver disease. *Am J Pathol* 160: 1445–1455.
- Grant SW, Kyshtoobayeva AS, Kurosaki T, et al.** (1998). Mutant p53 correlates with reduced expression of thrombospondin-1, increased angiogenesis, and metastatic progression in melanoma. *Cancer Detect Prev* 22: 185–94.
- Greenman C et al.** (2007). Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* (vol.446) 8 March: 153-158.
- Grieu F, Li WQ, Iacoppeta B.** (2004). Genetic polymorphisms in the MMP-2 and MMP-9 genes and breast cancer phenotype. *Breast Cancer Res Treat* 88: 197-204.
- Griffiths GL, Lumsden JH, Valli VEO.** (1984). Fine needle aspiration cytology and histologic correlation in canine tumors. *Vet Clin Pathol* 13: 13-17.
- Gross SS, Brent MR.** (2006). Using multiple alignments to improve gene predistion. In Proc. 9th Int'l Conf. on Research in Computational Molecular Biology (RECOMB '05):374-388 and *J Comput Biol* Mar 13(2): 379-93.
- Groves MR, Barford D.** (1999). Topological characteristics of helical repeat proteins. *Curr Opin Struct Biol.* 9: 383-389.
- Guerin M, Gabillot M, Mathieu MC, Travagli JP, Spielmann M, Andrieu N, Riou G.** (1989). Structure and expression of c-erbB-2 and EGF receptor genes in inflammatory and non-inflammatory breast cancer: prognostic significance. *Int J Cancer* 43: 201-208.
- Guo N, Krutzsch HC, Inman JK, Roberts DD.** (1997). Thrombospondin 1 and type 1 repeat peptides of thrombospondin 1 specifically induce apoptosis of endothelial cells. *Cancer Res* 57: 1735–1742.
- Haagensen C.** Diseases of the Breast, (ed 2). Philadelphia, PA, Saunders, 1971, pp 576-584.

- Hahn KA.** (2001). Practical indications and contraindications for tamoxifen. Proceeding The North American Conference. Small Animal and Exotics. Orlando, Florida. 665-666.
- Hampe JF, Misdorp W.** (1974). Tumours and dysplasias of the mammary gland. *Bull WHO* 50: 111-133.
- Hanahan D, Weinberg RA.** (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57.
- Hance KW, Anderson WF, Devesa SS, Young HA, Levine PH.** (2005). Trends in inflammatory breast carcinoma incidence and survival: the surveillance, epidemiology, and end results program at the National Cancer Institute. *J Natl Cancer Inst* 97: 966–975.
- Handin B, Wagner DD.** (1989). Molecular and cellular biology of von Willebrand factor. *Prog Hemost Thromb* 9: 233-259.
- Harris RE, Alshafie GA, Abou-Issa H, Seibert K.** (2000). Chemoprevention of breast cancer in rats by celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor. *Cancer Res* 60: 2101.
- Harris EE, Schultz D, Bertsch H, Fox K, Glick J, Solin LJ.** (2003). Ten-year outcome after combined modality therapy for inflammatory breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 55: 1200- 1208.
- Harvey HJ, Gilbertson SR.** (1977). Canine mammary gland tumors. *Vet Clin North Am* 7: 213-219.
- Harvey H, Lipton A, Lawrence B.** (1982). Estrogen receptors in inflammatory breast carcinoma. *J Surg Oncol* 21: 42-44.
- Hasbini A, Le Pechoux C, Roche B.** (2000). Alternating chemotherapy and hyperfractionated accelerated radiotherapy in non-metastatic inflammatory breast cancer. *Cancer Radiother* 4: 265–273.
- Hata K, Udagawa J, Fujiwaki R, Nakayama K, Otani H, Miyazaki K.** (2002). Expression of angiopoietin-1, angiopoietin-2, and Tie2 genes in normal ovary with corpus luteum and in ovarian cancer. *Oncology* 62: 340–348.
- Hayes AJ, Huang WQ, Yu J, Maisonpierre PC, Liu A, Kern FG, Lippman ME, McLeskey SW, Li LY.** (2000). Expression and function of angiopoietin-1 in breast cancer. *Br J Cancer* 83: 1154–1160.
- Hawighorst T, Skobe M, Streit M, Hong YK, Velasco P, Brown LF, Riccardi L, Lange-Asschenfeldt B, Detmar M.** (2002). Activation of the tie2 receptor by angiopoietin-1 enhances tumor vessel maturation and impairs squamous cell carcinoma growth. *Am J Pathol* 160: 1381–1392.
- He Y.** (2005). Vascular endothelial cell growth factor receptor 3-mediated activation of lymphatic endothelium is crucial for tumor cell entry and spread via lymphatic vessels. *Cancer Res* 65: 4739–4746.
- Heid CA, Stevens J, Livack K, Williams PM.** (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research* 6: 986-994.



- Hellmén E.** (1993). Canine mammary tumour cell lines established in vitro. *J Reprod Fertil Suppl* 47: 489-499.
- Hellmen E, Bergström R, Holmberg L, Spellingberg LB, Hansson K, Lindgren A.** (1993). Prognostic factors in canina mammary tumors: a multivariate study of 202 consecutive cases. *Vet Pathol* 30: 20-27.
- Hendrix MJ, Seftor EA, Hess AR, Seftor RE.** (2003). Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nat Rev Cancer* 3: 411-421.
- Henson KL.** Reproductive System. *In:* Raskin RE, Meyer DJ (eds): Atlas of Canine and Feline Cytology. Philadelphia, WB Saunders Co, 2001, pp. 277-288.
- Heppner GH.** (1984). Tumor heterogeneity. *Cancer Res* 44(6): 2259-2265.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R.** (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (NY)* 11:1026-1030.
- Hirano S.** (1997). In vitro and in vivo cytotoxic effects of nitric oxide on metastatic cells. *Cancer Lett* 115: 57-62.
- Hirata K, Ishida T, Penta K, Rezaee M, Yang M, Wolhgemuth J, Quertermous T.** (2001). Cloning of an Immunoglobulin Family Adhesion Molecule Selectively Expressed by Endothelial Cells. *J Biol Chem* 276: 16223–16231.
- Hirayama K, Yokota H, Onai R, Kobayashi T, Kumata T, Kihara K, Okamoto M, Sako T, Nakade T, Izumisawa Y, Taniyama H.** (2002). Detection of matrix metalloproteinases in canine mammary tumours: analysis by immunohistochemistry and zymography. *J Comp Pathol.* 127(4): 249-256.
- Hirvonen HE, Salonen R, Sandberg MW, Vuorio E, Västriik I, Kotilainen E, Kalimo H.** (1994). Differential expresión of myc, max and Rb1 genes in human gliomas and glioma cell lines. *Br J Cancer* 69: 16-25.
- Hodak E, Trattner A, David M, Kornbrot N, Modan B, Lurie H, Lawrie A, Harrison P, Sandbank M, Inbal A.**(1993). Quantitative and qualitative assessment of plasma von Willebrand factor in classic Kaposi's sarcoma. *J Am Acad Dermatol* 28: 217-221.
- Hoffman B, Liebermann DA.** (1998). The proto-oncogen c-myc and apoptosis. *Oncogene* 17: 3351-3357.
- Hoffmann B, Schuler G.** (2000). Receptors blockers- general aspects with respect to their use in domestic animal reproduction. *Anim Reprod Sci* 60-61: 295-312.
- Hollander M, Wolfe DA.** Nonparametric Statistical Methods, New York: John Wiley & Sons, 1973.
- Honma W, Kamiyama Y, Yoshinari K, Sasano H, Shimada M, Nagata K, Yamazoe Y.** (2001). Enzymatic characterization and interspecies difference of phenol sulfotransferases, ST1A forms. *Drug Metab Dispos* 29: 274–281.

**Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D, Yancopoulos G, Wiegand SJ.** (1999). Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* (Washington DC) 284: 1994–1998.

**Horbkirk R.** (1993). Steroid sulfation. *Trends Endocr Metab* 4: 69–74.

**Horbkirk R.** (1992). The molecular biology of RU486. Is there a role for antiprogestins in the treatment of breast cancer? *Endocr Rev* 13(2): 146–63.

**Howe LR, Subbaramaiah K, Brown AMC, Dannenberg JA.** (2001). Cyclooxygenase-2: A target for the prevention and treatment of breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* 8: 97.

**Humphreys RC, Lydon J, O'Malley BW, Rosen JM.** (1997). Mammary gland development is mediated by both stromal and epithelial progesterone receptors. *Mol Endocrinol* 11: 801–811.

**Hunter CP, Redmond CK, Chen VW.** (1993). Breast cancer: factors associated with stage at diagnosis in black and white women. Black/ White cancer survival Study Group. *J Natl Cancer inst* 85: 1129–1137.

**Hunter T.** (1997). Oncoprotein networks. *Cell* 8: 333–346.

**Huss WJ, Hanrahan CF, Barrios RJ, Simons JW, Greenberg NM.** (2001). Angiogenesis and prostate cancer: identification of a molecular progression switch. *Cancer Res* 61: 2736–2743.

**Hynes RO.** (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69: 11–25.

**Ibrahim EM, Ezzat AA, Baloush A, Hussain ZH, Mohammed GH.** (2000). Pregnancy-associated breast cancer: a casecontrol study in a young population with a high-fertility rate. *Med Oncol* 17: 293–300.

**Illera JC, Silván G, Pérez-Alenza MD, Sánchez-Archidona AR, Nieto A, Peña L.** (2003). The possible role of IGF-I and androgens in the development of canine inflammatory mammary carcinoma. 4<sup>th</sup> volumen de *Hormonal Carcinogenesis*.

**Illera JC, Pérez-Alenza MD, Nieto A, Jiménez MA, Silván G, Dunner S, Peña L.** (2006). Steroids and receptor in canine mammary cancer. *Steroids* 71: 541–548.

**Iwama A, Hamaguchi I, Hashiyama M, Murayama Y, Yasunaga K, Suda T.** (1993). Molecular cloning and characterization of mouse TIE and TEK receptor tyrosine kinase genes and their expression in hematopoietic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 195: 301–309.

**Iwao K, Miyoshi Y, Egawa C, et al.** (2000). Quantitative analysis of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  messenger RNA expression in breast carcinoma by real-time polymerase chain reaction. *Cancer* 89: 1732–38.

**Jackson DE, Ward CM, Wang R, Newman PJ.** (1997). The protein-tyrosine phosphatase SHP-2 binds platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) and

forms a distinct signaling complex during platelet aggregation. Evidence for a mechanistic link between PECAM-1- and integrin-mediated cellular signaling. *J Biol Chem* 272: 6986–6993.

**Jackson DG.** (2003). The Lymphatics Revisited: new Perspectives from the Hyaluronan Receptor LYVE-1. *Trends Cardiovasc Med* 13: 1-7.

**Jang BC, Sanchez T, Schaeffers HJ, Trifan OC, Liu CH, Creminon C, Huang CK, Hla T.** (2000). Serum withdrawal-induced post-transcriptional stabilization of cyclooxygenase-2 mRNA in MDA-MB-231 mammary carcinoma cells requires the activity of the p38 stress-activated protein kinase. *J Biol Chem* 275: 39507.

**Jaiyesimi IA, Buzdar AU, Hortobagyi G.** (1992). Inflammatory breast cancer: a review. *J Clin Oncol* 10: 1014-1024.

**Jenkins RB, Qian J, Lee HK, Huang H, Hirasawa K, Bostwick DG, Proffitt J, Wilber K, Lieber MM, Liu W, Smith DI.** (1998). A molecular cytogenetic analysis of 7q31 in prostate cancer. *Cancer Res* 58: 759–766.

**Jimenez B, Volpret OV, Crawford SE, Febbraio M, Silverstein RL, Bouck N.** (2000). Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin 1. *Nat Med* 6: 41–48.

**Jones R, Shpall E, Shogan J, et al.** (1990). The Duke AFM program intensive induction chemotherapy for the metastatic breast cancer. *Cancer* 66: 431-436.

**Jordan VC.** (1998). Estrogenos de diseño. Investigación y ciencia. 16-24.

**Jubb KW, Kennedy PC.** Pathology of Domestic Animals. 2nd Ed. Academic Press. Inc New York. USA. 344-348, 1970.

**Junqueira LC, Carneiro J.** Histología Básica. 42 edición. Masson. 1996.

**Kaczmarek J, Castellani P, Nicolo G, Spina B, Allemanni G, Zardi L.** (1994). Distribution of oncofetal fibronectin isoforms in normal, hyperplastic and neoplastic human breast tissues. *Int J Cancer* 59: 11–16.

**Kanae Y, Endoh D, Yokota H, Taniyama H, Hayashi M.** (2006). Expression of the PTEN tumor suppressor gene in malignant mammary gland tumors of dogs. *Am J Vet Res* 67(1): 127-133.

**Kanwar S, Woodman RC, Poon MC, Murohara T, Lefer AM, Davenpeck KL, Kubes P.** (1995). Desmopressin induces endothelial P-selectin expression and leukocyte rolling in postcapillary venules. *Blood* 86: 2760-2766.

**Karin M, Liu Z-g, Zandi E.** (1997). AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9: 240-246.

**Karkkainen MJ, et al.** (2004). Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nature Immunol* 5: 74–80.

- Kawahara N, Ono M, Taguchi K, et al.** (1998). Enhanced expression of thrombospondin-1 and hypovascularity in human cholangiocarcinoma. *Hepatology* 28: 1512–17.
- Keck T, Banasfche R, Werner J, Geghard MM, Herfarth C, Klar E.** (2001). Desmopressin impairs microcirculation in donor pancreas and early graft function after experimental pancreas transplantation. *Transplantation* 72(2): 202-209.
- Kim I, Kim HG, So JN, Kim JH, Kwak HJ, Koh GY.** (2000). Angiopoietin-1 regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-Kinase/Akt signal transduction pathway. *Circ Res* 86: 24–29.
- Kinzler KW, Vogelstein B.** (1997). Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 386: 76-763.
- Kitchell GN.** (1995). Mammary Tumors. In: Kirk's Current Veterinary Therapy XII. Small Animal Practice. Saunders, WB. Philadelphia. 1098- 1103.
- Kjoller L, Hall A.** (1999). Signaling to Rho GTPases. *Exp Cell Res* 253: 166-179.
- Kleer CG, van Golen KL, Merajver SD.** (2000). Molecular biology of breast cancer metastasis. Inflammatory breast cancer: clinical syndrome and molecular determinants. *Breast Cancer Res* 2: 423-429.
- Kleer CG, van Golen KL, Braun T, Merajver SD.** (2001). Persistent E-cadherin expression in inflammatory breast cancer. *Mod Pathol* 14: 458-464.
- Kleer CG, Zhang Y, Pan Q, van Golen KL, Wu ZF, Livant D, Merajver SD.** (2002). WISP3 is a novel tumor suppressor gene of inflammatory breast cancer. *Oncogene* 21: 3172-3180.
- Kleer CG, Zhang Y, Pan Q, Gallagher G, Wu M, Wu ZF, Merajver SD.** (2004). WISP3 and RhoC guanosine triphosphatase cooperate in the development of inflammatory breast cancer. *Breast Cancer Res* 6: R110-R115.
- Knight C, Martin J, Welch J.** (1986). Surgical considerations after chemotherapy and radiation therapy for inflammatory breast cancer. *Surgery* 99: 385-391.
- Koga K, Todaka T, Morioka M, Hamada J, Kai Y, Yano S, Okamura A, Takakura N, Suda T, Ushio Y.** (2001). Expression of angiopoietin-2 in human glioma cells and its role for angiogenesis. *Cancer Res* 61: 6248–6254.
- Koh E, Buzdar A, Ames F, et al.** (1990). Inflammatory carcinoma of the breast: Results of a combined modality approach at M. D. Anderson Cancer Center. *Cancer Chemoter Pharmacol* 27: 94-100.
- Kokal W, Hill C, Porudomisky D.** (1985). Inflammatory breast carcinoma: A distinct entity?. *J Surg Oncol* 30: 152-155.
- Koltz H.** Ueber mastitis carcinomatosa gravidarum et Lactatium. Halle, Germany, Lipke, 1869, p30.

- Kornblihtt AR, Pesce CG, Alonso CR, Cramer P, Srebrow A, Werbajh S, Muro AF.** (1996). The fibronectin gene as a model for splicing and transcription studies. *FASEB J* 10: 248–257.
- Kwon MS, Kim SJ, Lee SY, Jeong JH, Lee ES, Kang HS.** (2006). Epigenetic silencing of the sulfotransferase 1A1 gene by hypermethylation in breast tissue. *Oncol Rep* 15: 27–32.
- Kubo K, Matsuyama S, Katayama K, Tsutsumi C, Yonezawa K, Shimada T, Kotani T, Sakuma S, Ohashi F, Takamori Y.** (1998). Frequent expression of the c-kit proto-oncogene in canine malignant mammary tumor. *J Vet Med Sci* 60: 1335–1340.
- Kumar P, Wang JM, Bernabeu C.** (1996). CD105 and angiogenesis. *J Pathol* 178: 363–366.
- Kumar S, Ghellal A, Li C.** (1999). Breast carcinoma: vascular density determined using CD105 antibody correlates with tumor prognosis. *Cancer Res* 59: 856–861.
- Kurebayashi J, Otsuki T, Kunisue H, Mikami Y, Tanaka K, Yamamoto S, Sonoo H.** (1999). Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) family members in breast cancer. *Jpn J Cancer Res* 90: 977–981.
- Kurzman ID, Gilbertson SR.** (1986). Prognostic factors in canine mammary tumors. *Semin Vet Med Surg* 1: 25–31.
- Kuvaja P, Talvensaaari-Mattila A, Paakko P, Turpeenniemi-Hujanen T.** (2005). The absence of immunoreactivity for tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1), but not for TIMP-2, protein is associated with the favourable prognosis in aggressive breast carcinoma. *Oncology* 68: 196–203.
- Labat-Robert J.** (2002). Fibronectin in malignancy: Effect of aging. *Semin Cancer Biol* 12(3): 187–95.
- Lamb JR, Tugendreich S, Hieter P.** (1995). Tetra-ricopeptide repeat interactions: to PR or not to TPR?. *Trends Biochem Sci* 20: 257–259.
- Lambert E, Dasse E, Haye B, Patitfrere E.** (2004). TIMPs as multifacial prtoteins. *Crit Rev Oncol Hematol* 49: 187–198.
- Learmonth G.** (1916). Acute mammary carcinoma (Volkmann's Mastitis Carcinomatosis). *Can Med Assoc J* 6: 499–511.
- Lee B, Tannenbaum N.** (1924). Inflammatory carcinoma of the breast: A report of twenty-eight cases from the breast clinic of Memorial Hospital. *Surg Gynecol Obstet* 39: 580–595.
- Lee SH, Shiao YH, Kasprzak KS.** (1999). Nonradioactive mRNA differential display in polyacrylamide mini-gels. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 106: 108–114.
- Lee JO, Yang H, Georgescu MM, Di Cristofano A, Maehama T, Shi Y, Dixon JE, Pandolfi P, Pavletich N.P.** (1999). Crystal structure of the PTEN tumor suppressor:

implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell* 29; 99(3): 323-334.

**Lee SW, Reimer CL, Oh P, Campbel LDB, Schnitzer JE.** (1998). Tumor cell growth inhibition by caveolin re-expression in human breast cancer cells. *Oncogene* 16: 1391–1397.

**Leitch A.** (1909). Peu d'orange in acute mammary carcinoma. Its causes and diagnostic value. *Lancet* 1: 861-863.

**Lerebours F, Bertheau P, Bieche I, Driouch K, De The H, Hacene K, Espie M, Marty M, Lidereau R.** (2002). Evidence of chromosome regions and gene involvement in inflammatory breast cancer. *Int J Cancer* 102: 618-622.

**Lerebours F, Bertheau P, Bieche I, Plassa LF, Champeme MH, Hacene K, Toulas C, Espie M, Marty M, Lidereau R.** (2003). Two prognostic groups of inflammatory breast cancer have distinct genotypes. *Clin Cancer Res* 9: 4184-4189.

**Lerebours F, Bieche I, Lidereau R.** (2005). Update on inflammatory breast cancer. *Breast Cancer Res* 7: 52-58.

**Lerebours F, Vacher S, Andrieu C, Espie M, Marty M, Lidereau R, Bieche I.** (2008). NF-kappa B genes have a major role in Inflammatory Breast Cancer. *BMC Cancer* 8: 41.

**Levine P, Steinhorn S, Ries L, et al.** (1985). Inflammatory breast cancer. The experience of the Surveillance Epidemiology and End Results (SEER) Program. *J Natl Cancer Ins* 74: 291-297.

**Levine AJ.** (1997). p53: the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88: 323-331.

**Lewin B.** (1991). Oncogenic conversion by regulatory changes in transcription factors. *Cell* 64: 303-312.

**Liang P, Pardee AB.** (1992). Differential Display of Eukaryotic Messenger-RNA by Jeans of the Polymerase Chain-Reaction. *Science* 257: 967-971.

**Liang P, Pardee AB.** (1995). Recent advances in differential display. *Curr Opin Immunol* 7: 274-280.

**Liang P, Pardee AB.** (1998). Differential Display: a general protocol. *Mol Biotechnol* 10: 261-267.

**Liang PA.** (2002). Decade of differential display. *Biotechniques* 33 (2): 338-44, 346.

**Liao Z, Strom EA, Buzdar AU.** (2000). Locoregional irradiation for inflammatory breast cancer: effectiveness of dose escalation in decreasing recurrence. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 47: 1191–200.

**Liao DJ, Dickson RB.** (2002). Roles of androgens in the development, growth and carcinogenesis of the mammary gland. *J Steriod Biochem Mol Biol* 80: 175-189.

- Liau SL, Benda RK, Morris CG, Mendenhall NP.** (2004). Inflammatory breast carcinoma: outcomes with trimodality therapy for nonmetastatic disease. *Cancer* 100 920–928.
- Liu W, Saint DA.** (2002). A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. *Anal Biochem* 302: 52-59.
- Liu XH, Rose DP.** (1996). Differential expression and regulation of cyclooxygenase-1 and -2 in two human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 56: 5125.
- Livak KJ, Schmittgen TD.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25: 402-408.
- Loar AS.** (1989). Tumors of the genital tract and mammary gland. En Ettinger SJ (ed):Text Book of Veterinary Internal Medicine.Vol. II 3<sup>rd</sup> ed. WB Saunders. Philadelphia. 1814-1925.
- Lombardi P, Florio S, Pagnini U, Crispino A, Avallone L.** (1999). Ovarian function suppression with a GnRH analogue: D-ser(But[t])[6]-Arzgly[10]-LHRH (Goserelin) in hormone dependent canine mammary cancer. *J Vet Pharmacol Ther* 22(1): 56-61.
- Loridon-Rosa B, Vielh P, Matsuura H, Clausen H, Cuadrado C, Burtin P.** (1990). Distribution of oncofetal fibronectin in human mammary tumors: Immunofluorescence study on histological sections. *Cancer Res* 50(5): 1608–12.
- Loukopoulos P, Mungall PA, Straw RC, Thomson JR, Robinson WF.** (2003). Matrix metalloproteinase-2 and -9 involvement in canine tumors. *Vet Pathol* 40: 382-394.
- Low JA, Berman AW, Steinberg SM.** (2004). Long-term follow-up for locally advanced and inflammatory breast cancer patients treated with multimodality therapy. *J Clin Oncol* 22(20): 4067–4074.
- Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE.** (1993). p53-Dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 74: 957-967.
- Lucas F, Perez-Mesa C.** (1978). Inflammatory carcinoma of the breast. *Cancer* 41: 1595-1605.
- Lufkin EG, Fass DN, O'Fallon WV, Bowie EJ.** (1979). Increased von Willebrand factor in diabetes mellitus. *Metabolism* 28: 63-66.
- Lyons MS, Bell B, Stainier D, Peters KG.** (1998). Isolation of the zebrafish homologues for the tie- 1 and tie-2 endothelium-specific receptor tyrosine kinases. *Dev Dyn* 212: 133–140.
- Maggiolini M, Donze O, Jeannin E, Ando S, Picard D.** (1999). Adrenal androgens stimulate the proliferation of breast cancer cells as direct activators of estrogen receptor  $\alpha$ . *Cancer Res* 59: 4864-69.
- Maggiolini M, Carpino A, Bonofiglio D, Pezzi V, Rago V, Marsico S, Picard D, Andò S.** (2001). The direct proliferative stimulus of dehydroepiandrosterone on MCF7

breast cancer cells is potentiated by overexpression of aromatase. *Mol Cell Endocrinol* 184: 163-171.

**Maisonpierre PC, Goldfarb M, Yancopoulos GD, Gao G.** (1993). Distinct rat genes with related profiles of expression define a TIE receptor tyrosine kinase family. *Oncogene* 8: 1631-1637.

**Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD.** (1997). Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts *in vivo* angiogenesis. *Science* 277: 55-60.

**Malinen E, Kassinen A, Rinttila T, Palva A.** (2003). Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 5'-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria. *Microbiology* 149: 269-277.

**Maloisel F, Dufour P, Bergerat J, et al.** (1990). Results of initial doxorubicin, 5-fluoracil, and cyclophosphamide combination chemotherapy for inflammatory carcinoma of the breast. *Cancer* 65: 851-855.

**Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Pe'er J, Trent JM, Meltzer PS, Hendrix MJ.** (1999). Vascular channel formation by human melanoma cells *in vivo* and *in vitro*: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 155: 739-752.

**Manna PP, Frazier WA.** (2003). The mechanism of CD47 (IAP)-dependent killing of T cells: heterotrimeric G protein-dependent inhibition of protein kinase A. *J Immunol* 170: 3544-3553.

**Manna PP, Frazier WA.** (2004). CD47 mediates killing of breast tumor cells via Gi-dependent inhibition of protein kinase A. *Cancer Res* 64(3): 1026-36.

**Mareel M, Leroy A.** (2003). Clinical, Cellular, and Molecular Aspects of Cancer Invasion. *Physiological Reviews*, Vol. 83, No. 2. 337-376.

**Margaritopoulos JT, Kouretas D, Tsitsipis JA.** (2001). A modified method for the detection of differential display expressed mRNA without using radioactivity. *In vivo* 15: 245-247.

**Margolin K, Gordon MS, Holmgren E.** (2001). Phase Ib trial of intravenous recombinant humanized monoclonal antibody to vascular endothelial growth factor in combination with chemotherapy in patients with advanced cancer: pharmacologic and long-term safety data. *J Clin Oncol* 19: 851-856.

**Markham NR, Zuker M.** (2005). DINAMelt web server for nucleic acid melting prediction. *Nucleic Acids Res* Jul 1 (33): 577-581.

**Martin K, Pardee AB.** (2000). Identifying expressed genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 3789-3791.



**Martin TA, Watkins G, Lane J, Jiang WG.** (2005). Assessing microvessels and angiogenesis in human breast cancer, using VE-cadherin. *Histopathology* 46(4): 422-30.

**Marty M, Cognetti F, Maraninchi D.** (2005). Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment: the M77001 study group. *J Clin Oncol* 23: 4265–4274.

**Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, Zweifel BS, Settle SL, Woerner BM, Edwards DA, Flickinger AG, Moore RJ, Seibert K.** (2000). Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Res* 60: 1306.

**Mateo V, Lagneaux L, Bron D, Biron G, Armant M, Delespesse G, Sarfati M.** (1999). CD47 ligation induces caspase-independent cell death in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Med* 5: 1277–1284.

**Matrisian LM.** (1990). Metalloproteinases and their inhibitors in tissue remodelling. *Trends Genet* 6: 121–5.

**Matrisian LM.** (1992). The matrix degrading metalloproteinases. *Bioassays* 14: 455–63.

**Matrisian LM.** (1999). Extracellular proteinases in malignancy. *Current Biol.* 9: R776–8.

**Matsuno F, Haruta Y, Kondo M.** (1999). Induction of lasting complete regression of preformed distinct solid tumors by targeting the tumor vasculature using two new anti- $\alpha$ -v $\beta$ 3 monoclonal antibodies. *Clin Cancer Res* 5: 371-382.

**Matsuyama S, Nakamura M, Yonezawa K, Shimada T, Oashi F, Takamori Y, Kubo K.** (2001). Expresión Patterns of the erbB Subfamily mRNA in Canine Benign and Malign Mammary Tumors. *J Vet Med Sci* 63(9): 949-954.

**Matthews JM, Sunde M.** (2202). Zinc fingers: folds for many occasions. *IUBMB life* 54: 351-355.

**Maudelonde T, Romieu G, Ulmann A, Pujol H, Grenier J, Khalaf S, Cavalie G, Rocheford H.** (1987). First clinical trial on the use of the antiprogesterin ru486 in advanced breast cancer. En: Klijn JGM, Paridaens, R.; Foekens, J.A. (eds) hormonal manipulation of cancer peptides, growth factors and new anti-steroidal agents. Raven Press, New York, p 55.

**McCarthy NJ, Yang X, Linnoila IR, Merino MJ, Hewitt SM, Parr AL, Paik S, Steinberg SM, Hartmann DP, Murali N, et al.** (2002). Microvessel density, expression of estrogen receptor  $\alpha$ , MIB-1, p53, and c-erbB-2 in inflammatory breast cancer. *Clin Cancer Res* 8: 3857-3862.

**McCawely LJ, Matrisian LM.** (2000). Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumour progression. *Mo Med Today* 6: 149–56.

**Mc Ewen EG, Withrow SJ.** Tumors of the mammary glands. En: Withrow SJ, Mc Ewen EG eds, *Small Animal Clinical Oncology* 2<sup>nd</sup> ed, WB Saunders, Philadelphia. 356-372, 1996.

- McGuire WL.** (1980). Un update on oestrogen and progesterone receptors for primary and advanced breast cancer. In: Iacobelli (eds). *Hormones and Cancer*, Raven press, New York. 337-344.
- McGuire WL, Clark GM.** (1985). Role of progesterone receptors in breast cancer. *Semin Oncol* 12: 12-16.
- McGuire WL.** (1991). Breast cancer prognostic factors: evaluation guidelines. *J Natl Cancer Inst* 83: 154-155.
- Mc Leod DA, Thrall DA.** (1989). The combination of surgery and radiation in the treatment of cancer. *Vet Surg* 18 (1): 1-6.
- McRae GI, Roberts BB, Worden AC, Bajka A, Vickery BH.** (1985). Long-term reversible suppression of oestrus in bitches with nafarelin acetate, a potent LHRH agonist. *J Reprod Fertil* 74(2): 389-397.
- Meloche CA, Falany CN.** (2001). Expression and characterization of the human 3 beta-hydroxysteroid sulfotransferases (SULT2B1a and SULT2B1b). *J Steroid Biochem Mol Biol* 77: 261-269.
- Meloni GB, Dessolo S, Becchere MP, Soro D, Profili S, Cherchi PL, Cossu-Rocca P, Canalis GC.** (1999). Effectiveness of "core biopsy" by the mammotome device for diagnosis of inflammatory carcinoma. *Clin Exp Obstet Gynecol* 26: 181-182.
- Meyer A, Dockerty M, Harrington S.** (1948). Inflammatory carcinoma of the breast. *Surg Gynecol Obstet* 87: 417-424.
- Michna H, Scheider MR, Nishino Y, El Etreby MF.** (1989). The antitumor mechanism of progesterone antagonist is a receptor mediated antiproliferative effect by induction of terminal cell death. *J Steroid Biochem* 34: 447-453.
- Midulla M, Verma R, Pignatelli M, Ritter MA, Courtenay-Luck NS, George, AJT.** (2000). Source of oncofetal ED-B-containing fibronectin: implications of production by both tumor and endothelial cells. *Cancer Res* 60: 164-169.
- Miller KD, Chap LI, Holmes FA.** (2005). Randomized phase III trial of capecitabine compared with bevacizumab plus capecitabine in patients with previously treated metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 23: 792-799.
- Misdorp W.** (1988). Canine Mammary Tumours: protective effect of late ovariectomy and stimulating effect of progestins. *Vet Quart* 10: 26-33.
- Misdorp W, Else RW, Helmén E, Lipscomb TP.** Histological Classification of Mammary Tumors of the Dog and Cat. Second Series. Vol 7, Armed Forces Institute of Pathology and World Health Organization, Washington, 1999.
- Mohammed RA, Martin SG, Gill MS, Green AR, Paish EC, Ellis IO.** (2007). Improved Methods of Detection of Lymphovascular Invasion Demonstrate That It is the Predominant Method of Vascular Invasion in Breast Cancer and has Important Clinical Consequences. *Am J Surg Pathol* 31(12): 1825-1833.

- Moll UM, Riou G, Levine AJ.** (1992). Two distinct mechanisms alter p53 in breast cancer: mutation and nuclear exclusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 7262-7266.
- Mol JA, Selman PJ, Sprang EPM.** (1997). The role of progestins, insuline-like growth factor (IGF) and IGF-binding proteins in the normal and neoplastic mammary gland of the bitch: a review. *J Reprod Fertil Suppl* 51: 339-344.
- Montecchia MF, Molinolo A, Lanari C.** (1999). Reversal of estrogen-resistance in murine mammary adenocarcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 54(2): 93-99.
- Morris JS, Dabson JM, Bostock DE.** (1993). Use of tamoxifen in control of canine mammary neoplasia. *Vet Rec* 133: 539-542.
- Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT.** (1998). Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *BioTechniques* 24: 954-962.
- Motoike T, Loughna S, Perens E, Roman BL, Liao W, Chau TC, Richardson CD, Kawate T, Kuno J, Weinstein BM, Stainier DY, Sato TN.** (2000). Universal GFP reporter for the study of vascular development. *Genesis* 28: 75-81.
- Moulton JE.** Tumors in Domestic Animals, 3rd Edition. Berkley, University of California Press, 1999, pp. 518-543
- Mourali N, Muenz LR, Tabbane F, Belhassen S, Bahi J, Levine PH.** (1980). Epidemiologic features of rapidly progressing breast cancer in Tunisia. *Cancer* 46: 2741-2746.
- Muller PY, Janovjak H, Miserez AR, Dobbie Z.** (2002). Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *BioTechniques* 32: 1372-1379.
- Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM.** (1993). PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med* 178: 449-460.
- Muller WA, Randolph GJ.** (1999). Migration of leukocytes across endothelium and beyond: molecules involved in the transmigration and fate of monocytes. *J Leukoc Biol* 66: 698-704.
- Murakami Y, Tateyama S, Rungsipipat A, Uchida K, Yamaguchi R.** (2000). Immunohistochemical analysis of cyclin A, cyclin D1 and P53 in mammary tumors, squamous cell carcinomas and basal cell tumors of dogs and cats. *J Vet Med Sci* 62(7): 743-50.
- Murrel TGC.** (1991). Epidemiological and biochemical support for a theory on the cause and prevention of breast cancer. *Med Hypotheses* 36: 389-396.
- Murua Escobar H, Becker K, Bullerdiek J, Nolte I.** (2001). The canine ERBB-2 gene maps to a chromosome region frequently affected by aberrations in tumors of the dog (*Canis familiaris*). *Cytogenet Cell Genet* 94(3-4): 194-195.
- Nagase H.** (1997). Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 378: 151-60.

- Nakatsugi S, Oht T, Kawamori T, Mutoh M, Tanigawa T, Watanabe K, Sugie S, Sugimura T, Wakabayashi K.** (2000). Chemoprevention by nimesulide, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP)-induced mammary gland carcinogenesis in rats. *Jap J Cancer Res* 91: 886.
- Nasdala I, Wolburg-Buchholz K, Wolburg H, Kuhn A, Ebnet K, Brachtendorf G, Samulowitz U, Kuster B, Engelhardt B, Vestweber D, Butz S.** (2002). A transmembrane tight junction protein selectively expressed on endothelial cells and platelets. *J Biol* 277(18): 16294-303.
- Natali P, Nicotra M, Sures L, Santoro E, Bigotti A, Ullrich A.** (1992). Expression of c-kit receptor in normal and transformed human non-lymphoid tissues. *Cancer Res* 52: 6139-6143.
- Nelson LW, Kelly WA.** (1974). Changes in canine mammary gland histology during the estrous cycle. *Toxicol Appl Pharmacol* 27: 113-122.
- Nelson RW, Couto CG.** (1995). *Pilares de Medicina Interna en Animales Pequeños*. Intermedica. Buenos Aires. Argentina. 622-624.
- Nerurkar VR, Sehadri R, Mulherkar R, Ishward CS, Lalitha VS, Naik SN.** (1987). Receptors for epidermal growth factor and estradiol in canine mammary tumors. *Int J Cancer* 40: 230-232.
- Newman PJ, Brendt MC, Gorski J, White G.** (1990). PECAM-I (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science* 247: 1219-1223.
- Nichini F, Holdman L, Lapayoker M.** (1972). Inflammatory carcinoma of the breast in a 12-year-old-gril. *Arch. Surg* 105: 505-508.
- Nicolson GL.** (1984). Tumor progression, oncogenes and the evolution of metastatic phenotypic diversity. *Clin Exp Metastasis* 2(2): 85-105.
- Nierodzik ML, Kajumo F, Karpatkin S.** (1992). Effect of thrombin treatment of tumor cells on adhesion of tumor cells to platelets in vitro and tumor metastasis in vivo. *Cancer Research* 52: 3267-3272.
- Nieto A, Peña L, Pérez-Alenza MD, Sánchez MA, Flores JM, Castaño M.** (2000). Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pothological associations and prognostic significance. *Vet Pathol* 37: 239-247.
- Nieto A, Perez-Alenza M D, Del Castillo N, Tabanera E, Castano M, Pena L.** (2003). BRCA1 expression in canine mammary dysplasias and tumours: relationship with prognostic variables. *J Comp Pathol* 128(4): 260-268.
- Orre M, Rogers PA.** (1999). VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, microvessel density and endothelial cell proliferation in tumours of the ovary. *Int J Cancer* 84: 101-108.
- Oka H, Shiozaki H, Kobayashi K, Inoue M, Tahara H, Kobayashi T, Takatsuka Y, Matsuyoshi N, Hirano S, Takeichi M.** (1993). Expression of E-cadherin cell adhesion

molecule in human breast cancer tissues and its relationship to metastasis. *Cancer Res* 53: 1696–1701.

**Okada H, Nishuma Y, Yoshino T, Grone A, Capen CC, Rosol TJ.** (1997). Immunohistochemical localization of parathyroid hormone related protein in canine mammary tumors. *Vet Pathol* 34: 356-359.

**Overmoyer B, Robertson K, Persons M.** (2001). A phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of SU5416 and doxorubicin (ADR) in inflammatory breast cancer (IBC), *Proceedings Annual Meeting ASCO* 21 Abstract 391.

**Owen LN.** (1966). Mammary neoplasia in the dog and cat. III. Prognosis and treatment of mammary tumours in the bitch. *J Small Anim Pract* 7: 703-710.

**Paczuski R, Bialkowska A, Kotschy M, Burduk D, Betlejewski S.** (1999). Von Willebrand factor in plasma of patients with advanced stages of larynx cancer. *Thromb Res* 95: 197-200.

**Palangie T, Mosseri V, Mihura J, Campana F, Beuzeboc P, Dorval T, Garcia-Giralt E, Jouve M, Scholl S, Asselain B, et al.** (1994). Prognostic factors in inflammatory breast cancer and therapeutic implications. *Eur J Cancer* 7: 921-927.

**Palmer SA, Wiegand AP, Maldarelli H, Bazmi JM, Mican M, Polis RL, Dewar, Planta A.** (2003). New real-time reverse transcriptase-initiated PCR assay with single-copy sensitivity for human immunodeficiency virus type I RNA in plasma. *J Clin Microbiol* 41: 4531-4536.

**Panades M, Olivotto IA, Speers CH.** (2005). Evolving treatment strategies for inflammatory breast cancer: a population based survival analysis. *J Clin Oncol* 23: 1941–1950.

**Papparella S, Restucci B, Paciello O, Maiolino P.** (2002). Expression of matrix metalloprotease-2 (MMP-2) and the activator membrane type 1 (MT1-MMP) in canine mammary carcinomas. *J Comp Pathol* May; 126(4): 271-6.

**Paradiso A, Tommasi S, Brandi M, et al.** (1989). Cell kinetics and hormonal receptor status in inflammatory breast carcinoma : comparison with locally advanced disease. *Cancer* 64: 1922-1927.

**Park DS, Lee H, Riedel C, Hult J, Scherer PE, Pestell RG, Lisanti MP.** (2001). Prolactin negatively regulates caveolin-1 gene expression in the mammary gland during lactation, via a Ras-dependent mechanism. *J Biol Chem* 276: 48389–48397.

**Parodi AL, Mialot JP, Martin PM.** (1984). Canine and feline mammary cancers as animal models for hormone-dependent human breast tumors: relationships between steroid receptor profiles and survival rates. *Progress in Cancer Research and Therapy* 31: 357-365.

**Pasqualini JR, Gelly C, Lecerf F.** (1986). Estrogen sulfates: biological and ultrastructural responses and metabolism in MCF-7 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 8: 233-240.

- Pasqualini JR, Gelly C, Nguyen BL, Vella C.** (1989). Importance of estrogen sulfates in breast cancer. *J Steroid Biochem.* 34: 155-163.
- Pasculaini JR, Chetrite G, Blacker C, Feinstein MC, Delalonde L, Talbi M, Maloche C.** (1996). Concentrations of estrone, estradiol, and estrone sulfate and evaluation of sulfatase and aromatase activities in pre- and postmenopausal breast cancer patients. *J Clin Endocrinol Metab* 81(4):1460-4.
- Peña L, Nieto AI, Pérez-Alenza MD, Cuesta P, Castaño M.** (1998). Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables. *J Vet Diagn Invest* 10: 237-246.
- Peña L, Pérez-Alenza MD, Rodríguez-Bertos A, Nieto A.** (2003). Canine inflammatory mammary carcinoma: histopathology, immunohistochemistry and clinical implications of 21 cases. *Breast Cancer Res Treat* 78: 141-148.
- Peña L, Silván G, Pérez-Alenza MD, Nieto A, Illera JC.** (2003). Steroid hormone profile of canine inflammatory mammary carcinoma: a preliminary study. *J Steroid Biochem Mol Biol* 84: 211-216.
- Perez CA, Brady LW.** (1987). Introduction. Perez CA and Brady LW (eds): Principles and Practice of Radiation Oncology. Philadelphia, JB Lippincott: 148-155.
- Perez CA, Fields JN, Fracasso PM.** (1994). Management of locally advanced carcinoma of the breast. II. Inflammatory carcinoma. *Cancer* 74: 466-476.
- Pérez-Alenza MD, Peña L, Del Castillo N, Nieto AI.** (2000). Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. *J Small Anim Pract* 41: 287-291.
- Pérez-Alenza MD, Tabanera E, Peña L.** (2001). Inflammatory mammary carcinoma in dogs: 33 cases (1995-1999). *J Am Vet Med Assoc* 219: 110-114.
- Pérez-Alenza MD, Jiménez A, Nieto AI, Peña L.** (2004). First description of feline inflammatory mammary carcinoma: clinicopathological and immunohistochemical characteristic of three cases. *Breast Cancer Res* 6: 300-307.
- Perez-Mesa C.** Pathology of mammary carcinoma, in Spratt JS, Jr, Donegan WL (eds): Cancer of the Breast. Philadelphia, PA, Saunders 1967, pp 70-87.
- Perou CM, Sorlie T, Elsen MB.** (2000). Molecular portraits of human breast tumors. *Nature* 407: 747-752.
- Peters W, Shpall E, Jones R, et al.** (1988). High-dose combination alkylating agents with bone marrow support as initial treatment for metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 61: 1368-1376.
- Peters KG, Coogan A, Berry D, Marks J, Iglehart JD, Kontos CD, Rao P, Sankar S, Trogan E.** (1998). Expression of Tie2/Tek in breast tumour vasculature provides a new marker for evaluation of tumour angiogenesis. *Br J Cancer* 77: 51-56.

**Peters KG, Kontos CD, Lin PC, Wong AL, Rao P, Huang L, Dewhirst MW, Sankar S.** (2004). Functional significance of Tie2 signaling in the adult vasculature. *Recent Prog Horm Res* 59: 51-71.

**Pettersen RD, Hestdal K, Olafsen MK, Lie SO, Lindberg FP.** (1999). CD47 signals T cell death. *J Immunol* 162: 7031-7040.

**Pezzella F, Pastorino U, Tagliabue E, Andreola S, Sozzi G, Gasparini G, Menard S, Gatter KC, Harris AL, Fox S, Buyse M, Pilotti S, Pierotti M, Rilke F.** (1997). Non-small-cell lung carcinoma tumor growth without morphological evidence of neo-angiogenesis. *Am. J Pathol* 151: 1417-1423.

**Pfaffl MW, Tichopad A, Prohmet C, Neuvians TP.** (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* 26: 509-515.

**Philibert.** RU 46534 Affinité relative de liaison pour les récepteurs stéroïdiens - activité antiprogesterone in vivo. Reporte de Studio Interno Roussel Uclaf, 1994.

**Piera J, Alonso M, Ojeda M, et al.** (1986). Locally advanced breast cancer with inflammatory component: a clinical entity with poor prognosis. *Radiother Oncol* 7: 199-204.

**Pippar EC, Hall AJ, Barber DJ, Bridges BA.** (1988). Cancer in homozygotes and heterozygotes of ataxia-telangiectasia anexenoderma pigmentosum in Britain. *Cancer Res* 48: 2929-2932.

**Pol A, Luetterforst R, Lindsay M, Heino S, Ikonen S, Ikonen E, Parton RG.** (2001). A caveolin dominant negative mutant associates with lipid bodies and induces intracellular cholesterol imbalance. *J Cell Biol* 152(5): 1057-1070.

**Pottinger BE, Read RC, Paleolog EM, Higgins PG, Pearson JD.** (1989). Von Willebrand factor is an acute phase reactant in man. *Thromb Res* 53: 387-394.

**Prevo R, Banerji S, Ferguson D, Jackson DG.** (2001). Mouse LYVE-1 is an endocytic receptor for hyaluronan in lymphatic endothelium. *J Biol Chem* 276: 19,420-19,430.

**Prins J, De Vries EGE, Mulder NH.** (1993). The myc family of oncogenes and their precense and improtance in small-cell lung carcinoma and other tumour types. *Anticancer Res* 13: 1373-1386.

**Prost S, Le MG, Douc-Rasy S, Ahomadegbe JC, Spielmann M, Guerin M, Riou G.** (1994). Association of c-erbB-2-gene amplification with poor prognosis in non-inflammatory breast carcinomas but not in carcinomas of the inflammatory type. *Int J Cancer* 58: 763-768.

**Rabinovich G.** Inmunopatología Molecular Nuevas Fronteras de la Medicina. 1ed. Ed. Panamericana. Buenos Aires. Argentina, 2004.

**Radinsky R, Ellis LM.** (1996). Molecular determinants in the biology of liver metastasis. *Surg Oncol Clin N Am* 5(2): 215-29.

**Rafii S, Lyden D, Benezra R, Hattori K, Heissig B.** (2002). Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy?. *Nat Rev Cancer* 2: 826-835.

**Ramón y Cajal S.** Carcinogénesis humana. VI Simposium sobre oncogenes y cáncer. Madrid 10 y 11 de Mayo de 2000.

**Razani B, et al.** (2001). Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *J Biol Chem* 276: 38121–38138.

**Reese DM, Slamon DL.** (1997). HER-2/neu signal transduction in human breast and ovarian cancer. *Stem Cells* 15 1–8.

**Restucci B, Papparella S, De Vico G, Maiolino P.** (1997). E cadherin expression in normal and neoplastic canine mammary gland. *J Comp Pathol* 116(2): 191-202.

**Restucci B, Papparella S, Maiolino P, De Vico G.** (2002). Expression of vascular endothelial growth factor in canine mammary tumors. *Vet Pathol* 39(4): 488-93.

**Restucci B, Borzacchiello G, Maiolino P, Martano M, Paciello O, Papparella S.** (2004). Expression of vascular endothelial growth factor receptor Flk-1 in canine mammary tumours. *J Comp Pathol* 130(2-3): 99-104.

**Rice A, Quinn CM.** (2002). Angiogenesis, thrombospondin, and ductal carcinoma *in situ* of the breast. *J Clin Pathol* 55: 569–574.

**Rice AJ, Steward MA, Quinn CM.** (2002). Thrombospondin 1 protein expression relates to good prognostic indices in ductal carcinoma in situ of the breast. *J Clin Pathol* 55: 921–925.

**Ridley AJ.** (2001). Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci* 114: 2713-2722.

**Righi L, Deaglio S, Pecchioni C, Gregorini A, Horenstein AL, Bussolati G, Sapino A, Malavasi F.** (2003). Role of CD31/platelet endothelial cell adhesion molecule-1 expression in in vitro and in vivo growth and differentiation of human breast cancer cells. *Am J* 162(4): 1163-74.

**Riou G, Le MG, Travagli JP, Levine AJ, Moll UM.** (1993). Poor prognosis of p53 gene mutation and nuclear overexpression of p53 protein in inflammatory breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 85: 1765-1767.

**Ripoll GV, Girón G, Tejera AM, Gomez DE, Alonso DF.** (2004). La desmopresina (DDAVP) modifica la producción de angiostatina y reduce la angiogénesis inducida por células tumorales mamarias. *Medicina (Buenos Aires)* 64 (Supl. 2): 364.

**Rochefford H.** (1992). Biological and clinical significance of cathepsin D in breast cancer. *Acta Oncol* 31: 125-132.

**Rodriguez-Manzanique JC, Lane TF, Ortega MA, Hynes RO, Lawlerand J, Iruela-Arispe ML.** (2001). Thrombospondin 1 suppresses spontaneous tumor growth and



inhibits activation of matrix metalloproteinase-9 and mobilization of vascular endothelial growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 12485–12490.

**Rogers C, Fitts W.** (1956). Inflammatory carcinoma of the breast. A critique of therapy. *Surgery* 39: 367-370.

**Rooney MT, Henry JB.** (1933). Marcadores moleculares de las neoplasias malignas. Diagnostico y tratamiento clínicos. 9 ed. Masson-salva. Medicina. Barcelona. 293-315.

**Rosenberg SA.** (2001). Principles of cancer management: Biological therapy. En DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds): *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (ed 6). Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. 307–333.

**Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RG.** (1992). Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 68: 673–682.

**Rouesse J, Friedman S, Mouriesse H, Sarrazin D, Spielmann M.** (1990). Therapeutic strategies in inflammatory breast carcinoma based on prognostic factors. *Breast Cancer Res Treat* 16: 15-22.

**Rozen S, Skaletsky HJ.** Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers: In: Krawetz s, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386, 2000.

**Ruggeri ZM.** (1991). Structure and function of von Willebrand factor: relationship to von Willebrand disease. *Mayo Clinic Proceedings* 66: 847-861.

**Ruiz Simón A, Climent MA, Lluch Ana, Llombart A, Moya V, Fernández-Martos C, Guillelm V.** (2000). Inflammatory breast carcinoma: pathological or clinical entity? *Breast Cancer Res Treat* 64: 269–273.

**Rutteman GR, Bevers MM., Misdorp W, Van den Brom WE.** (1989). Anterior pituitary function in female dogs with mammary tumors II: Prolactin. *Anticancer Res* 9: 241-246.

**Rutteman GR.** (1990). Hormones and mammary tumour disease in the female dog. An update. *In Vivo* 4: 33-40.

**Rutteman GR.** (1995). Mammary Tumors in the Dog. En: Kirk's Current Veterinary Therapy XII. Small Animal Practice. Saunders, WB. Philadelphia. 518- 522.

**Rutteman GR, Withrow SJ, MacEwen EG.** Tumors of the Mammary Gland. In: Winthrow SJ, MacEwen EG (eds): *Small Animal Clinical Oncology*, 3rd ed. Philadelphia, WB Saunders Co, 2000, pp. 450-467.

**Sager R, Sheng S, Anisowicz A, Sotiropoulou G, Zou Z, Stenman G, Swisshelm K, Chen Z, Hendrix MJC, Pemberton P, Rafidi K, Ryan, K.** (1994). RNA genetics of breast cancer: maspin as a paradigm. *Cold Spring Harbor Sym Quant Biol* LIX: 537–546.

**Saltzstein S.** (1974). Clinically occult inflammatory carcinoma of the breast. *Cancer* 34: 382-388.

- Sánchez-Archidona AR, Jiménez MA, Pérez-Alenza D, Silván G, Illera JC, Peña L, Dunner S.** (2007). Steroid pathway and oestrone sulphate production in canine inflammatory mammary carcinoma. *J Steroid Biochem Mol Biol* 104(3-5): 93-9.
- Sarli G, Preziosi R, De Tolla L, Brunetti B, Benazzi C.** (2004). E-cadherin immunoreactivity in canine mammary tumors. *J Vet Diagn Invest* 16(6): 542-7.
- Scherer PE, Okamoto T, Chun M, Nishimoto I, Lodish HF, Lisanti MP.** (1996). Identification, sequence and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 131-135.
- Schmittgen TD, Zakrajsek BA, Mills AG, Gorn V, Singer MJ, Reed MW.** (2000). Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Anal. Biochem* 285: 194-204.
- Schneider R, Dorn C.R, Taylor DO.** (1969). Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *J Natl Cancer Inst.* 43(6): 1249-1261.
- Schor AM, Rushton G, Ferguson JE, Howell A, Redford J, Schor SL.** (1994). Phenotypic heterogeneity in breast fibroblasts: Functional anomaly in fibroblasts from histologically normal tissue adjacent to carcinoma. *Int J Cancer* 59(1): 25-32.
- Schor SL, Ellis IR, Jones SJ, Baillie R, Seneviratne K, Clausen J, et al.** (2003). Migration-stimulating Factor: A genetically truncated onco-fetal fibronectin isoform expressed by carcinoma and tumor-associated stromal cells. *Cancer Res* 63(24): 8827-36.
- Schumann E.** (1911). A study of carcinoma mastoids. *Ann Surg* 54: 69-77.
- Selman P, Mol J, Rutteman G, Rijnberk A.** (1994). Progestin treatment in the dog. I. Effects on growth hormone, insulin-like growth factor I and glucose homeostasis. *Eur J Endocrinol* 131: 413-421.
- SEER:** Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program. Public-Use Database (1973-2002), National Cancer Institute, DCCPS, Surveillance Research Program, Cancer Statistics Branch, based on the November 2004 submission, 2005, [www.seer.cancer.gov](http://www.seer.cancer.gov).
- Seon BK, Matsuno F, Haruta Y.** (1997). Long-lasting complete inhibition of human solid tumors in SCID mice by targeting endothelial cells of tumor vasculature with antihuman endoglin immunotoxin. *Clin Cancer Res* 3: 1031-1044.
- Seshadri R, Firgaira FA, Horsfall DJ.** (1993). Clinical significance of HER-2/neu oncogene amplification in primary breast cancer. The South Australian Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 11: 1936-1942.
- Sfacteria A, Bertani C, Costantino G, Del Bue M, Paiardini M, Cervasi B, Piedimonte A, De Vico G.** (2003). Cyclin D1 expression in pre-cancerous and cancerous lesions of the canine mammary gland. *J Comp Pathol* 128(4): 245-251.

- Sherry M, Johnson D, Page D, et al.** (1995). Inflammatory carcinoma of the breast : Clinical review and summary of the Vanderbilt experience with multimodal therapy. *Am J Med* 79: 355- 364.
- Sheperd PR, Withers DJ, Siddle K.** (1998). Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem J* 333: 471-490.
- Shi YE, Liu YE, Lippman ME, Dickson RB.** (1994). Progestins and antiprogestins in mammary tumour growth and metastasis. *Hum Reprod* 9 (Suppl. 1): 162-173.
- Shibuya M.** (2001). Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Struct Funct* 26: 25-35.
- Shibuya M.** (2003). Vascular endothelial growth factor receptor-2: its unique signaling and specific ligand, VEGF-E. *Cancer Sci* 94: 751-756.
- Shibuya M.** (2006). Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *J. Biochem. Mol. Biol.* 39: 469–478.
- Shirakawa K, Tsuda H, Heike Y, Kato K, Asada R, Inomata M, Sasaki H, Kasumi F, Yoshimoto M, Iwanaga T, et al.** (2001). Absence of endothelial cells, central necrosis, and fibrosis are associated with aggressive inflammatory breast cancer. *Cancer Res* 61: 445-451.
- Shirakawa K, Shibuya M, Heike Y, Takashima S, Watanabe I, Konishi F, Kasumi F, Goldman CK, Thomas KA, Bett A, Terada M, Wakasugi H.** (2002). Tumor-infiltrating endothelial cells and endothelial precursor cells in inflammatory breast cancer. *Int J Cancer* 99(3): 344-51.
- Shridhar V, Sun QC, Miller OJ, Kalemkerian GP, Petros J, Smith DI.** (1997). Loss of heterozygosity on the long arm of human chromosome 7 in sporadic renal cell carcinomas. *Oncogene* 15: 2727–2733.
- Silzle T, Randolph GJ, Kreutz M, Kunz-Schughart LA.** (2004). The fibroblast: Sentinel cell and local immune modulator in tumor tissue. *Int J Cancer* 108(2): 173–80.
- Singh B, Lucci A.** (2002). Role of Cyclooxygenase-2 in Breast Cancer. *J Sur Res* 108 : 173–179.
- Sjogren S, Inganas M, Nordberg T, Lindgren A, Nordberg H, Holmberg L, Bergh J.** (1997). The p53 gene in breast cancer: prognostic value of complementary DNA sequencing versus immunohistochemistry. *J Nat Cancer Inst* 88: 173-182.
- Shatalova EG, Walther SE, Favorova OO, Rebbeck TR, Blanchard RL.** (2005). Genetic polymorphisms in human SULT1A1 and UGT1A1 genes associate with breast tumor characteristics: a case-series study. *Breast Cancer Res* 7: 909-921.
- Shim WS, Teh M, Mack PO, Ge R.** (2001). Inhibition of angiopoietin-1 expression in tumor cells by an antisense RNA approach inhibited xenograft tumor growth in immunodeficient mice. *Int J Cancer* 94: 6–15.

**Shull RM, Madduz JM.** Subcutaneous glandular tissue: Mammary, salivary, thyroid and parathyroid. In: Cowell RL, Tyler RD, Munkoth JH (eds): Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat. St. Louis, Mosby, 1999, pp. 90-92.

**Singh B, Lucci A.** (2002). Role of Cyclooxygenase-2 in Breast Cancer. *Journal of Surgical Research* 108: 173–179.

**Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S.** (2001). Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344: 783–792.

**Sokolov BP, Prockop DJ.** (1994). A rapid and simple PCR-based method for isolation of cDNAs from differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res* 22: 4009-4015.

**Sonnenschein EG, Glickman LT, Goldschmidt MH, McKee LJ.** (1991). Body conformation, diet, and risk of breast cancer in pet dogs: a case-control study. *J Am Epidemiol* 133: 694-703.

**Sorenmo KU, Shofer FS, Goldschmidt MH.** (2000). Effect of spaying and timing of spaying on survival of dogs with mammary carcinoma. *J. Vet. Int Med.* 14: 266-270.

**Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, Woerner BM, Khan KN, Masferrer J, Koki AT.** (2000). COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. *Cancer* 89: 2637.

**Sottile J, Hocking DC.** (2002). Fibronectin polymerization regulates the composition and stability of extracellular matrix fibrils and cell-matrix adhesions. *Mol Biol Cell* 13(10): 3546–59.

**Souaze F, Ntodou-Thome A, Tran CY, Rostene W, Forgez P.** (1996). Quantitative RT-PCR: limits and accuracy. *BioTechniques* 21: 280-285.

**Speirs V, Parkes AT, Kerin MJ, et al.** (1999). Co-expression of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$ : poor prognostic factor in human breast cancer?. *Cancer Res* 59: 525-28.

**Speirs V, Atkin SL** (1999). Production of VEGF and expression of the VEGF receptors Flt-1 and KDR in primary cultures of epithelial and stromal cells derived from breast tumours. *Br J Cancer* 80: 898-903.

**Strange R., Friis RR., Bemis LT, Geske FJ.** (1995). Programmed cell death during mammary gland involution. *Methods Cell Biol* 46: 355-68.

**Subbaramaiah K, Telang N, Ramonetti JT, Araki R, DeVito B, Weksler BB, Dannenberg AJ.** (1996). Transcription of cyclooxygenase-2 is enhanced in transformed mammary epithelial cells. *Cancer Res* 56: 4424.

**Sugarbaker EV.** (1979). Cancer metastasis: a product of tumor-host interaction. *Curr Prob Cancer* 3: 1.

**Susaneck SJ, Allen TA, Hoopes J, Withrow SJ, Macy DW.** (1983). Inflammatory mammary carcinoma in the dog. *J Am Anim Hosp Assoc* 19: 971-976.

- Stanton H, Gavrilovic J, Atkinson SJ.** (1998). The activation of proMMP-2 (gelatinase A) by HT1080 fibrosarcoma cells is promoted by culture on a fibronectin substrate and is concomitant with an increase in processing of MT1-MMP (MMP-14) to a 45 kDA form. *J Cell Sci* 111: 2789–2798.
- Stein J, Liang P.** (2002). Differential display technology: a general guide. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59: 1235-1240.
- Stoeltzing O, Ahmad SA, Liu W, McCarty MF, Wey JS, Parikh AA, Fan F, Reinmuth N, Kawaguchi M, Bucana CD, Ellis LM.** (2003). Angiopoietin-1 inhibits vascular permeability, angiogenesis, and growth of hepatic colon cancer tumors. *Cancer Res* 63: 3370–3377.
- Stratmann A, Risau W, Plate KH.** (1998). Cell type-specific expression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 suggests a role in glioblastoma angiogenesis. *Am J Pathol* 153: 1459–1466.
- Streit M, Riccardi L, Velasco P, Brown LF, Hawington T, Bornstein P, Detmar M.** (1999). Thrombospondin-2: a potent endogenous inhibitor of tumor growth angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 14888–14893.
- Swain SM, Lippman ME.** (1989). Treatment of patients with inflammatory breast cancer. *Important Adv Oncol* 129– 150.
- Sweeney JD, Killion KM, Pruet CF, Spaulding MB.** (1990). von Willebrand factor in head and neck cancer. *Cancer* 11: 2387-2389.
- Swift M, Reitnauer PJ, Morrell D, Chase CL.** (1987). Breast and others cancers in families with ataxia-telangiectasia. *N Eng J Med* 316: 1289-1294.
- Takeichi M.** (1993). Catherins in cancer. *Curr Opin Cell Biol* 5: 806-811.
- Talonpoika J, Paunio K, Soderling E.** (1993). Molecular forms and concentration of fibronectin and fibrin in human gingival crevicular fluid before and after periodontal treatment. *Scand J Dent Res* 101: 375–381.
- Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K.** (2005). The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res* 65: 550–563.
- Tanaka S, Mori M, Sakamoto Y, Makuuchi M, Sugimachi K, Wands JR.** (1999). Biologic significance of angiopoietin-2 expression in human hepatocellular carcinoma. *J Clin Invest* 103: 341–345.
- Tanaka S, Sugimachi K, Yamashita YY, Ohga T, Shirabe K, Shimada M, Wands JR, Sugimachi K.** (2002). Tie2 vascular endothelial receptor expression and function in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 35: 861–867.
- Taylor G, Meltzer A.** (1938). Inflammatory carcinoma of the breast. *Am J Cancer* 33: 33-49.

**Tavassoli FA.** Pathology of the Breast. 2<sup>nd</sup> edn, McGraw-Hill, New York, 1999, pp 519-522, 538-541.

**Tavassoli FA.** (1999). Inflammatory carcinoma. Infiltrating carcinoma: special 434 types, in: *Pathology of the Breast*, 2nd ed., McGraw-Hill, New York, pp. 519–522, 538–541.

**Teichert-Kuliszewska K, Maisonpierre PC, Jones N, Campbell AI, Master Z, Bendeck MP, Alitalo K, Dumont DJ, Yancopoulos GD, Stewart DJ.** (2001). Biological action of angiopoietin-2 in a fibrin matrix model of angiogenesis is associated with activation of Tie2. *Cardiovasc Res* 49: 659–670.

**Theilen GH, Madewell BR.** Veterinary Cancer Medicine. 2nd. Ed. Gordon Theilen y Bruce Madewell. Philadelphia USA 392-407, 1987.

**Theis M, de Wit C, Schlaeger TM, Eckardt D, Kruger O, Doring B, Risau W, Deutsch U, Pohl U, Willecke K.** (2002). Endothelium-specific replacement of the connexin43 coding region by a lacZ reporter gene. *Genesis* 29: 1–13.

**Thijssen JJH, Blankenstein MA, Miller WR, Milewicz A.** (1987). Estrogen in tissues: uptake from the peripheral circulation or local production. *Steroids* 50: 1–3.

**Thomas F, Arriagada R, Spielmann M.** (1995). Pattern of failure in patients with inflammatory breast cancer treated by alternating radiotherapy and chemotherapy. *Cancer* 76: 2286–2290.

**Tichopad A, Dilger M, Scharz G, Plaffl MW.** (2003). Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. *Nucleic Acids Res* 31: 122.

**Toi M, Taniguchi T, Yamamoto Y, et al.** (1996). Clinical significance of the determination of angiogenic factors. *Eur J Cancer* 32<sup>a</sup>: 2513-2519.

**Tomlinson JS, Alpaugh ML, Barsky SH.** (2001). An intact overexpressed E-cadherin/alpha,beta-catenin axis characterizes the lymphovascular emboli of inflammatory breast carcinoma. *Cancer Res* 61: 5231-5241.

**Tsoi C, Falany CN, Morgenstern R, Swedmark S.** (2001). Identification of a new subfamily of sulphotransferases: cloning and characterization of canine SULT1D1. *Biochem J* 356: 891–897.

**Tsubura A, Hatano T, Murata A, Shoji T, Shikata N, Morii S.** (1991). Breast carcinoma in patients receiving neuroleptic therapy. Morphologic and clinico-pathologic features of thirteen cases. *Acta Pathol Japon* 7: 494-499.

**Tsuchida S, Ikemoto S, Tagawa M.** (2001). Microsatellite polymorphism in intron 14 of the canine BRCA1 gene. *J Vet Med Sci* 63(4): 479-481.

**Turpin E, Bieche I, Bertheau P, Plassa LF, Lerebours F, de Roquancourt A, Olivi M, Espie M, Marty M, Lidereau R, et al.** (2002). Increased incidence of ERBB-2 overexpression and TP53 mutation in inflammatory breast cancer. *Oncogene* 21: 7593-7597.

**Tuszynski GP, Nicosia RF.** (1994). Localization of thrombospondin and its cysteine-serine-valine-threonine-cysteine-glycine-specific receptor in human breast carcinoma. *Lab Invest* 70: 228–33.

**Tvedten H, Cowell R.** Cytology of neoplasia and inflammatory masses. *In*: Williard M, Tvedten H, Turnwald G (eds): *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods*. Philadelphia, WB Saunders Co, 1999, p. 328.

**Ueno NT, Buzdar AU, Singletary SE, Ames FC, McNeese MD, Holmes FA, Theriault RL, Strom EA, Wasaff BJ, Asmar L, et al.** (1997). Combined-modality treatment of inflammatory breast carcinoma: twenty years of experience at M.D. Anderson Cancer Center. *Cancer Chemother Pharmacol* 40: 321–329.

**Urquidi V, Sloan D, Kawai K, Agarwal D, Woodman AC, Tarin D, Goodison S.** (2002). Contrasting expression of thrombospondin-1 and osteopontin correlates with absence or presence of metastatic phenotype in an isogenic model of spontaneous human breast cancer metastasis. *Clin Cancer Res* 8: 61–74.

**Utsumi T, Yoshimura N, Takeuchi S, Ando J, Maruta M, Maeda K, Harada N.** (1999). Steroid sulfatase expression is an independent predictor of recurrence in human breast cancer. *Cancer Res* 59: 377–381.

**Valenzuela DM, Griffiths JA, Rojas J, Aldrich TH, Jones PF, Zhou H, McClain J, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Huang T, Papadopoulos N, Maisonnier PC, Davis S, Yancopoulos GD.** (1999). Angiopoietins 3 and 4: diverging gene counterparts in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 1904–1909.

**Valtola R, Salven P, Heikkila P, Taipale J, Joensuu H, Rehn M, Pihlajaniemi T, Weich H, deWaal R, Alitalo K.** (1999). VEGFR-3 and its ligand VEGF-C are associated with angiogenesis in breast cancer. *Am J Pathol* 154: 1381–1390.

**Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F.** (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes: *Genome Biol* 3(7); research0034.1-0034-11.

**Van der Auwera I, Benoy I, Elst H, Van Laere S, Van Marck EA, Colpaert C, Van Dam P, Vermeulen PB, Dirix LY.** (2003). Quantitative study of the angiogenic profile of inflammatory and noninflammatory breast cancer using real-time RT-PCR [abstract]. *Breast Cancer Res Treat* 82: s135.

**Van der Auwera I, Van Laere SJ, van Dam P, Colpaert CG, Fox SB, Turley H, Harris AL, Van Marck EA, Vermeulen PB, Dirix LY.** (2004). Increased angiogenesis and lymphangiogenesis in inflammatory versus noninflammatory breast cancer by real-time reverse transcriptase-PCR gene expression quantification. *Clin Cancer Res* 10 (23): 7965–7.

**Van den Eynden GG, Van Laere SJ, Van der Auwera I, Merajver SD, Van Marck EA, van Dam P, Vermeulen PB, Dirix LY, van Golen KL.** (2006). Overexpression of caveolin-1 and -2 in cell lines and in human samples of inflammatory breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* Feb; 95(3): 219–28.

**Van Ganderen E, Schalken JA.** (2002). Morphogenic and tumorigenic potentials of the mammary growth hormone/growth hormone receptor system. *Molecular and Cellular Endocrinology* 197: 153-165.

**van Golen KL, Davies S, Wu ZF, Wang Y, Bucana CD, Root H, Chandrasekharappa S, Strawderman M, Ethier SP, Merajver SD.** (1999). A novel putative low-affinity insulin-like growth factor-binding protein, LIBC (lost in inflammatory breast cancer), and RhoC GTPase correlate with the inflammatory breast cancer phenotype. *Clin Cancer Res* 5: 2511-2519.

**van Golen KL, Wu ZF, Qiao XT, Bao LW, Merajver SD.** (2000). RhoC GTPase, a novel transforming oncogene for human mammary epithelial cells that partially recapitulates the inflammatory breast cancer phenotype. *Cancer Res* 60: 5832-5838.

**van Golen KL, Bao L, DiVito MM et al.** (2002). Reversión of RhoC GTPase-induced inflammatory breast cancer phenotype by treatment with a farnesyl transferase inhibitor. *Mol Cancer Ther* 1: 575-583.

**van Golen KL.** (2006). Is caveolin-1 a viable therapeutic target to reduce cancer metastasis?. *Expert Opin Ther Targets* Oct; 10(5): 709-721.

**Van Laere SJ, Van der Auwera I, Van den Eynden GG.** (2005). Distinct molecular signature of inflammatory breast cancer by cDNA microarray analysis. *Breast Cancer Res and Treat* 93: 237-246.

**Van Laere SJ, Van den Eynden GG, Van der Auwera I, Vandenberque M, van Dam P, Van Marck EA, van Golen KL, Vermeulen PB, Dirix LY.** (2006). Identification of cell-of origin breast tumor subtypes in inflammatory breast cancer by gene expression profiling. *Breast Cancer Res and Treat* 95 (3): 243-55.

**Vanzulli SI, Soldati R, Meiss R, Colombo L, Molinolo AA, Lanari C.** (2005). Estrogen or antiprogesterone treatment induces complete regression of pulmonary and axillary metastases in an experimental model of breast cancer progression. *Carcinogenesis* 26(6): 1055-1063.

**Veldhoen N, Watterson J, Brash M, Milner J.** (1999). Identification of tumour-associated and germ line p53 mutations in canine mammary cancer. *Br J Cancer* 81(3): 409-15.

**Vermeulen A, Deslypere JP, Paridaens R.** (1986). Steroid dynamics in the normal and carcinomaous mammary gland. *J Steroid Biochem* 25: 799-802.

**Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB.** (1996). Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer* 32<sup>a</sup>: 2474-2484.

**Veronesi A, Frustaci S, Tielli U, et al.** (1981). Tamoxifen therapy in postmenopausal advanced breast cancer. Efficacy at the primary tumor site in 46 evaluable patients. *Tumori* 67: 235-238.



- Vicent D, Ilany J, Kondo T, Naruse K, Fisher SJ, Kisanuki YY, Bursell S, Yanagisawa M, King GL, Kahn CR.** (2003). The role of endothelial insulin signaling in the regulation of vascular tone and insulin resistance. *J Clin Invest* 111: 1373–1380.
- Volm M, Koomagi R, Mattern J.** (1999). Angiogenesis and cigarette smoking in squamous cell lung carcinomas: an immunohistochemical study of 28 cases. *Anticancer Res* 19: 333–6.
- von Volkmann R, Bruts K.** Beitrage zur chirurgie. Leipzig, Germany, Breitkopf und Hartel, 1875, pp 319-334.
- Vogel PM, Georgiade NG, Fetter BF, Vogel FS, McCarty S Jr.** (1981). The correlation of histologic changes in the human reast with the menstrual cycle. *Am J Pathol* 104: 23-24.
- Wakui S, Muto T, Yokoo K, Yokoo R, Takahashi H, Masaoka T, Hano H, Furusato M.** (2001). Prognostic status of p53 mutation in canine mammary carcinoma. *Anticancer Res* 21: 611-616.
- Walshe JM, Swain SM.** (2005, 2006). Clinical aspects of inflammatory breast cancer. *Breast Disease* 2: 35-44.
- Wan JS, Sharp SJ, Poirier GM, Wagaman PC, Chambers J, Pyati J, Hom YL, Galindo JE, Huvar A, Peterson PA, Jackson MR, Erlander MG.** (1996). Cloning differentially expressed mRNAs. *Nat Biotechnol* 14: 1685-1691.
- Wedam S, Low J, Yang X, et al.** (2004). A pilot study to evaluate response and angiogenesis after treatment with bevacizumab in patients with inflammatory breast cancer. *Proceedings Annual Meeting ASCO* 22 Abstract 578.
- Weigelt B, Verduijn P, Bosma AJ, Rutgers EJ, Peterse HL, Van't Veer LJ.** (2004). Detection of metastases in sentinel lymph nodes of breast cancer patients by multiple mRNA markers. *Br J Cancer* 90: 1531-1537.
- Weinstat-Saslow DL, Zabrenetzky VS, VanHoutte K, FrazierWA, Roberts DD, Stegg PS.** (1994). Transfection of thrombospondin 1 complementary DNA in to a human breast carcinoma cell line reduces primary tumor growth, metastatic potential and angiogenesis. *Cancer Res* 54: 6504–6511.
- Weir EC, Burtis WJ, Morris CA, Insogna KL.** (1998). Isolation of a 16.000-dalton parathyroid hormone-like protein from two animal tumors causing hormonal hypercalcemia of malignancy. *Endocrinology* 123(6): 2744-2751.
- Weiss L.** (1990). Metastatic inefficiency. *Adv Cancer Res* 54: 159-211
- Wilke D, Colwell B, Dewar R.** (1998). Inflammatory breast carcinoma: comparison of survival of those diagnosed clinically, pathologically, or both features. *Am Surg* 64: 428-431.
- Wilkinson GT.** (1971). The treatment of mammary tumors in the bitch and a comparison with the cat. *Vet Rec* 29: 13-19.

- Wingo PA, Jamison PM, Young JL, Gargiullo P.** (2004). Population-Based Statistics for Women Diagnosed with Inflammatory Breast Cancer (United States). *Cancer Causes Control* 15: 321–328.
- Withrow SJ.** (1975). Surgical management of canine mammary tumors. *Vet Clin North Am* 5(3): 495–506.
- Witton CJ, Hawe SJK, Cooke TG, Bartlett JMS.** (2004). Cyclooxygenase 2 (COX-2) expression is associated with poor outcome in ER-negative, but not ER-positive, breast cancer. *Histopathology* 45: 47–54.
- Witzenbichler B, Maisonpierre PC, Jones P, Yancopoulos GD, Isner JM.** (1998). Chemotactic properties of angiopoietin-1 and -2, ligands for the endothelial-specific receptor tyrosine kinase Tie2. *J Biol Chem* 273: 18514–18521.
- Wong ML, Meandro JF.** (2005). Real-time for mRNA quantitation. *BioTechniques* 39: 75–85.
- Wong SY, Purdie AT, Han P.** (1992). Thrombospondin and other possible related matrix proteins in malignant and benign breast disease. An immunohistochemical study. *Am J Pathol* 140: 1473–1482.
- Wu M, Wu ZF, Kumar-Sinha C, Chinnaiyan A, Merajver SD.** (2004). RhoC induces differential expression of genes involved in invasion and metastasis in MCF10A breast cells. *Breast Cancer Res Treat* 84: 3–12.
- Wu W, Shu X, Hovsepyan H, Mosteller RD, Broek D.** (2003). VEGF receptor expression and signaling in human bladder tumors. *Oncogene* 22: 3361–3370.
- Würtz SØ, Schrohl A-S, Sørensen NM, Lademann U, Christensen IJ, Mouridsen H, Brünner N.** (2005). Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* 12: 125–227.
- Wysocki AB, Grinnell F.** (1990). Fibronectin profiles in normal and chronic wound fluid. *Lab Invest* 63: 825–831.
- Xia W, Mullin RJ, Keith BR, et al.** (2002). Anti-tumor activity of GW572016: a dual tyrosine kinase inhibitor blocks EGF activation of EGFR/erbB-2 and downstream Erk1/2 and AKT pathways. *Oncogene* 21: 6255–6263.
- Yamada K, Nakayama M, Nakano H, Mimura N, Yoshida S.** (1993). Endothelium dependent vasorelaxation evoked by desmopressin and involvement of nitric oxide in rat aorta. *Am J Physiol* 264(2 Pt 1): E203–207.
- Yamagami T, Kobayashi T, Takahashi K, Sugiyama M.** (1996). Prognosis for canine malignant mammary tumors based on TNM and histologic classification. *J Vet Med Sci Nov* 58(11): 1079–1083.
- Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J.** (2000). Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 407: 242–248.

**Yang CH, Cristofanilli M.** (2005, 2006). Systemic Treatments for Inflammatory Breast Cancer. *Breast Disease* 22: 55-65.

**Yokota H., Kumata T, Taketaba S, Kobayashi T, Moue H, Taniyama H, Hirayama K, Kagawa Y, Itoh N, Fujita O, Nakade T, Yuasa A.** (2001). High expression of 92 kDa type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9) in canine mammary adenocarcinoma. *Biochim Biophys Acta* 7; 1568(1): 7-12.

**Zagzag D, Hooper A, Friedlander DR, Chan W, Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD, Grumet M.** (1999). *In situ* expression of angiopoietins in astrocytomas identifies angiopoietin-2 as an early marker of tumor angiogenesis. *Exp Neurol* 159: 391–400.

**Zhang W, Razani B, Altschuler Y, Bouzahzah B, Mostov KE, Pestell RG, Lisanti MP.** (2000). Caveolin-1 inhibits epidermal growth factor-stimulated lamellipod extension and cell migration in metastatic mammary adenocarcinoma cells (MTLn3). Transformation suppressor effects of adenovirus-mediated gene delivery of caveolin-1. *J Biol Chem* 275: 20717–20725.

**Zhang W, Ran S, Sambade M, Huang X, Thorpe PE.** (2002). A monoclonal antibody that blocks VEGF binding to VEGFR2 (KDR/Flk-1) inhibits vascular expression of Flk-1 and tumor growth in an orthotopic human breast cancer model. *Angiogenesis* 5: 35-44.

**Zhou QS, Zhao YM, Xu CS, Yu ZY, Yao DY, Gao YM, Ruan CG.** (1992). Increase in plasma thrombomodulin and decrease in plasma von Willebrand factor after regular radiotherapy in patients with cancer. *Thromb Res* 68: 109-118.

**Zhou J, NG S, Adesanya-Famuiya O, Anderson K, Boundy CA.** (2000). Testosterone inhibits estrogen-induced mammary epithelial proliferation and suppresses estrogen receptor expression. *FASEB J* 14 (12) 502: 1725–1730.

## ***XII. ANEXOS***



## ***XII. ANEXOS***

### **PUBLICACIONES:**

#### **Artículo:**

Sánchez-Archidona AR, Jiménez MA, Pérez-Alenza D, Silván G, Illera JC, Peña L, Dunner S. (2007). **Steroid pathway and oestrone sulphate production in canine inflammatory mammary carcinoma.** *J Steroid Biochem Mol Biol* 104(3-5):93-9.

#### **Póster:**

**“Comparación de la expresión molecular del receptor de estrógenos  $\beta$  y del receptor de andrógenos en carcinomas inflamatorios mamarios caninos y tumores mamarios malignos caninos no inflamatorios”.** Autores: Sánchez-Archidona AR, Pérez-Alenza MD, Silván G, Illera JC, Peña L, Dunner S. Presentado en **XVII Reunión de la Sociedad Española de Anatomía Patológica Veterinaria**. Celebrado en Jarandilla de la Vera, los días 4, 5 y 6 de Junio de 2005. Publicado en el Libro de actas.

**“Androgen receptor in the canine mammary inflammatory carcinoma: immunohistochemistry, gene expression, and androgen level in serum and tissue”.** Autores: Sánchez-Archidona AR, Jiménez MA, Pérez-Alenza MD, Silván G, Illera JC, Peña L, Dunner S. Presentado en **Acto de celebración del aniversario del nacimiento de Severo Ochoa**. Celebrado el 16 de Noviembre de 2005, en la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid. Publicado en el Libro de actas.

**“Androgen, Estrogen and their receptors in the canine inflammatory mammary carcinoma”.** Autores: Sánchez-Archidona AR, Jiménez MA, Pérez-Alenza MD, Silván G, Illera JC, Peña L, Dunner S. Presentado en **17<sup>th</sup> International Symposium of the Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology “Recent Advances in Steroid Biochemistry & Molecular Biology”**.



## Steroid pathway and oestrone sulphate production in canine inflammatory mammary carcinoma<sup>☆</sup>

Ana R. Sánchez-Archidona<sup>a</sup>, María A. Jiménez<sup>b</sup>, Dolores Pérez-Alenza<sup>b</sup>,  
Gema Silván<sup>c</sup>, Juan C. Illera<sup>c</sup>, Laura Peña<sup>b</sup>, Susana Dunner<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Dpto. Producción Animal, Facultad de Veterinaria, UCM, 28040 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Dpto. Medicina y Cirugía Animal (Anatomía Patológica), Facultad de Veterinaria, UCM, 28040 Madrid, Spain

<sup>c</sup> Dpto. Fisiología Animal, Facultad de Veterinaria, UCM, 28040 Madrid, Spain

### Abstract

Spontaneous canine mammary inflammatory carcinoma (IMC) shares epidemiologic, histopathologic and clinical characteristics with the inflammatory breast carcinoma (IBC) disease in humans. We have analysed the steroids levels in serum and in tissue homogenates of IMC, the expression of two of their receptors (androgen and  $\beta$ -estrogen) and of three enzymes included in the steroidogenesis pathway (aromatase (CYP19A1), steroid sulphatase (STS) and estrogen sulfotransferase (EST)) trying to explain the specific accumulation of steroids in IMC tissues generating deposits in the form of lipid droplets whose presence can be attributed to steroids secreted by IMC cells. According to our working hypothesis, oestrone sulphate would be the main component of these lipid droplets. The presence of these steroid deposits would contribute to the intense proliferation and invasive behaviour of IMC and IBC, although their involvement in angiogenesis is yet to be demonstrated.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Steroid hormones; Steroid receptors; Oestrone sulphate pathway; Canine inflammatory mammary carcinoma

### 1. Introduction

Inflammatory breast carcinoma (IBC) is a rare form of human mammary carcinoma considered the most malignant type of breast cancer. IBC has a poor survival rate [1–3] and accounts for 6% of diagnosed breast cancers. Given that nodules are often absent and that chemotherapy is usually rapidly started before surgery, it is difficult to obtain IBC specimens for research purposes. Thus, several IBC cell lines have been established [4]. The use of animal models is another option, and spontaneous inflammatory mammary carcinoma (IMC) in the dog shares epidemiology, histopathology and clinical characteristics with the disease in humans [5–7].

The clinical presentation of IBC or IMC resembles that of an inflammatory process such as dermatitis or mastitis [8].

The only distinctive feature for a histological diagnosis is massive invasion of dermal lymph nodes by neoplastic cells [7], which block lymph drainage provoking the characteristic oedema [8,9]. Highly angiogenic, invasive and metastatic [10] characteristics are common and exclusive to both IBC and canine IMC. In the latter there is also histopathological evidence of lipid droplets, whose formation mechanism is still unclear but whose presence could be attributed to steroids secreted by IMC cells [7].

Two genes are differentially expressed in IBC [4], namely RhoC GTPase, a Ras-related guanosine triphosphatase that is overexpressed in IBC and seems to act as an oncogene, and loss of Wisp3, a tumour suppressor belonging to the IGFBP-rP family [4]. These two specific markers of IBC and other known genes, such as HMG-CoA reductase, H-Nuc/cdc27 and deoxyhypusine synthase, may be involved in breast cancer progression. Although these and other genes probably contribute to the mode of invasion of IBC, steroid formation is crucial for neoplastic growth and progression of inflammatory breast carcinoma.

Neoplastic mammary gland is an endocrine tissue by the local biosynthesis of estrogens [11,12]. Two principal

<sup>☆</sup> Poster paper presented at the 17th International Symposium of the Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 'Recent Advances in Steroid Biochemistry and Molecular Biology' (Seefeld, Austria, 31 May–03 June 2006).

\* Corresponding author. Tel.: +34 91 394 3765; fax: +34 91 394 3772.

E-mail address: [dunner@vet.ucm.es](mailto:dunner@vet.ucm.es) (S. Dunner).



pathways are implicated in the last steps of  $17\beta$ -estradiol formation in breast cancer tissues: the ‘aromatase pathway’ [13,14] which transforms androgens into estrogens, and the ‘sulfatase pathway’ which converts estrone sulphate into estrone by the STS [15–17].

The significant role played by the oestrone sulphatase (STS) pathway in human breast cancers has long been suggested by several authors, who demonstrated oestrone sulphate concentrations to be higher in cancerous than in non-cancerous breast tissue [18,19].

Further studies have shown that oestrogens that are locally produced in human breast cancer tissue may contribute to tumour progression [11,12] leading to metastasis, to the extent that STS mRNA expression correlates well with disease-free survival and is an independent prognostic factor for human breast cancer.

Little is known, however, about the mechanisms responsible for steroid hormone production in IBC. Thus, to improve current knowledge on this particular type of breast cancer and using IMC as a natural model for the study of IBC [7] here we compare canine inflammatory mammary carcinoma (IMC) with canine malignant non-IMC mammary tumours (MMT) and with normal mammary tissue, in terms of the specific steroidogenesis characteristics of IMC. For this purpose, we examined androgen and oestrogen receptor expression levels, three enzymes catalysing steroid changes (aromatase (CYP19A1), steroid sulphatase (STS) and estrogen sulfotransferase (EST)) and several steroid hormones (progesterone (P4), dehydroepiandrosterone (DHEA), androstenedione (A4), testosterone (T),  $17\beta$ -oestradiol (E2) and oestrone-sulphate (SO4E1)). Our findings reveal the atypical behaviour of IMC characterised by the production of lipid droplets.

In non-inflammatory breast carcinomas, high levels of oestrogens formed through the action of oestrone sulphatase on oestrone sulphate have been described, leading to the build up of non-conjugated oestrogens [14]. In IMC, there is also an accumulation of steroids but these, however, seem to be mainly oestrone sulphate. According to our working hypothesis, oestrone sulphate would build in this type of inflammatory carcinoma to generate deposits up because of the low expression of STS in the form of lipid droplets. The presence of these deposits would in turn contribute to the intense proliferation and invasive behaviour of IMC and IBC, although their involvement in angiogenesis is yet to be demonstrated.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals and sampling procedure

Mammary tissue specimens were surgically obtained from 23 bitches recruited over a 2-year period: 6 with spontaneous malignant (histological malignant grade III) non-IMC mammary tumours (MMT), 11 with spontaneous IMC, and

6 control animals with no history of any disease. The stage in the oestrous cycle at the time of sampling was established by taking vaginal smears and only animals at anoestrus were included in the study. Three tissue fragments were separated from each specimen and fixed in buffered formalin (to be processed for histopathology and immunohistochemistry), frozen (for enzyme immuno-assay), or preserved in RNA later (SIGMA), for expression analysis by real time PCR (RT-PCR).

### 2.2. Histopathology and immunohistochemistry

Histopathological diagnoses and immunohistochemical staining for the oestrogen  $\beta$  receptor (ER $\beta$ ) and androgen receptor (AR) were performed according to previously described procedures [20]. Briefly, tissue samples were fixed in formalin, embedded in paraffin and cut into 4- $\mu$ m thick sections. Deparaffined sections were then immunolabelled for ER $\beta$  and AR by the streptavidin–biotin complex peroxidase method. The primary antibodies used were the rabbit polyclonal antibodies antiER $\beta$  (dilution 1:50) (Upstate Biotechnology) and antiAR (dilution 1:15) (Neomarkers), corresponding to the N-terminal domain of both receptors (manufacturer’s information). Labelled cells were counted with the help of a computer-assisted image analyser (Olympus Microimage TM image analysis, software v4.0) and a tumour was considered positive when more than 10% of the cells were receptor positive in five microscopy fields (20 $\times$ ) selected at random. The intensity of immunostaining was also scored simultaneously by two observers as low, moderate or intense depending on the staining shown by most of the nuclei.

### 2.3. Steroid concentrations in serum and tissue homogenates

Frozen tissue specimens were homogenized in 4 ml of PBS (pH 7.2) and centrifuged at 3500 rpm, for 20 min at 4 °C. Progesterone, dehydroepiandrosterone, androstenedione, testosterone, oestrone sulphate and  $17\beta$ -oestradiol were determined by enzyme-immunoassay in the tissue homogenates and also in serum samples.

### 2.4. RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was extracted using a commercial kit (RNeasy<sup>®</sup> Midi Kit, QIAGEN) from breast tissue samples, preserved in RNA later (SIGMA) and frozen at –80 °C. After checking its integrity, the RNA was aliquoted and preserved in RNA secure<sup>TM</sup> Reagent (AMBION) at –80 °C. The isolated RNA was reverse transcribed using the iScript<sup>TM</sup> cDNA Synthesis Kit (BIORAD) in a standard mixture containing 2  $\mu$ l of total RNA in a 20  $\mu$ l reaction volume. The heat conditions for reverse transcription were 25 °C for 5 min, 42 °C for 30 min, 85 °C for 5 min and finally, rapid cooling to 4 °C.

Table 1  
Primers used for the RT-PCR analysis

Primer	GenBank no.	Sequence	T <sup>a</sup> melting (°)
ERβ-N	AF197950	Forward: 5'-GCTACCTGGCTCTGGATGAG-3'; reverse: 5'-AGTCATTCTCGTCCGGTGGT-3'	67.2
ERβ-Z	AF197950	Forward: 5'-CCAAGTTCAAAGAGGGATGC-3'; reverse: 5'-CTTCACACGACCAGACTCCA-3'	65.2
ERβ-C	AF197950	Forward: 5'-GGATGGAGGTGCTAATGGTG-3'; reverse: 5'-GAACGAGGTCTGGAGCAAAG-3'	62
AR-N	AJ313196	Forward: 5'-GCTACCTGGCTCTGGATGAG-3'; reverse: 5'-AGTCATTCTCGTCCGGTGGT-3'	61.6
AR-Z	AJ313196	Forward: 5'-GTCTGATCTGCGGTGATGAA-3'; reverse: 5'-CTTCACACGACCAGACTCCA-3'	60
AR-C	AJ313196	Forward: 5'-GACCAGATGGCAGTCATTC-3'; reverse: 5'-AGGTCAGGGGCGAAGTAGAG-3'	61.6
Aromatase	XM540989	Forward: 5'-CCTCGTGCGTATGGTAACAG-3'; reverse: 5'-ACCCAGTTCGTTGCTGACTT-3'	61.6
STS	XM548847	Forward: 5'-ATGACCTGATGCCGCTACTT-3'; reverse: 5'-GAACTTGGGCGTGAAGAAGA-3'	61.6
EST	XM845548.1	Forward: 5'-GTGAGCGAGATCCTGGACAT-3'; reverse: 5'-AATCCCTGGAGCCTTGAAC-3'	61.7
GAPDH	NM001003142	Forward: 5'-TGCACCACCAACTGCTTGGC-3'; reverse: 5'-GGCATGGACGGTGGTCATGAG-3'	62.7
β-Actin	XM536888	Forward: 5'-CTGGAACGGAGAAGGTGACA-3'; reverse: 5'-AAGGACTTCTGTGAACAATGCA-3'	62
18S	AY262732	Forward: 5'-CGGCTACCACATCCTATGAA-3'; reverse: 5'-TGGAGCTGGAATTACCGCGG-3'	60

Indicated are the primer name, GenBank Accession Number, primer sequence and melting temperature used.

## 2.5. Primer design

Primers were designed based on GenBank sequences for AR, ERβ, CYP19A1, STS, EST, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), 18S rRNA and β-actin using Primer3 software (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3-www.cgi>) and the Oligo Analysis and Plotting Tool (QIAGEN; <http://www.operon/oligos/toolkit.php>). The sequences for these primers are provided in Table 1. We examined all three domains (N-terminal, DNA binding and steroid binding) of the AR and ESRβ receptors.

## 2.6. Analysis of mRNA expression by RT-PCR

Messenger RNA expression reactions were performed in an iCycler TM Thermal Cycler (BIORAD) using the fluorescent dye SYBR Green I (Molecular probes). Two microliters of each reverse transcription reaction diluted 1/10 were amplified using AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems). The following concentrations were used for PCR: 1× PCR Buffer II, 2 mM MgCl<sub>2</sub> solution, 0.8 mM deoxynucleotide triphosphate, 0.3 μM each of forward and reverse primers, SYBR Green diluted 1:10,000 in sterile water from a 10,000× stock solution and 0.2 U/reaction of polymerase. Buffer blanks contained all the reaction components without cDNA. All samples were run in duplicate. The cycling conditions were: (stage 1) 95 °C for 8 min and (stage 2), 45 cycles at 95 °C for 30 s, 61.6 °C for AR, CYP19A1 and STS, 67.2 °C for ESRβ and 61.7 for EST, for 15 s and 72 °C for 40 s. In the final cycle (stage 3), the products were heated slowly to 95 °C to allow fluorescence measurements to be used to generate a dissociation curve from which the degree of product purity was assessed. This was accomplished by confirming the presence of a single peak at the known product melting temperature and the absence of any primer dimers that may generate a peak at a lower temperature [21].

Standard curves were produced from serial dilutions of samples and used to evaluate the consistency of the enzyme

reactions for each gene. The house-keeping genes used to check for variations due to RNA isolation in samples and PCR efficiency were 18S rRNA, GAPDH and β-actin.

## 2.7. Statistical analysis

Data obtained by real time RT-PCR were log transformed using the qBase system [22]. All dependent variables (either expression and immunohistochemistry data) were adjusted through a linear model with a single independent variable which was the canine tissue type with three levels (normal, MMT and IMC). Independent ANOVAs were carried out for each variable to test significant differences among the three canine tissue groups. All data were processed using the PROC GLM with SAS system. Immunohistochemical data were expressed as low, moderate and high staining intensities. These categorical variables were analysed by Pearson and Yates  $\chi^2$ -tests. The grade of statistical concordance between AR and ERβ positive/negative immunostaining was analysed by the  $\kappa$ -test. For all statistical comparisons, the level of significance was set at  $p < 0.05$ .

## 3. Results

Mean values for hormones, hormone receptors and enzymes measured by enzyme-immunoassay, immunohistochemistry and quantitative PCR in different mammary tissue samples corresponding to normal, canine malignant non-IMC mammary tumours (MMT) and inflammatory mammary carcinoma (IMC) are shown in Table 2.

Serum levels of the hormones dehydroepiandrosterone (DHEA), androstenedione (A4), testosterone (T), and oestrone sulphate (SO4E1) were significantly higher in the IMC tissue specimens than in the non-IMC tumours. 17β-Oestradiol concentrations were significantly lower in IMC specimens compared to non-IMC specimens (MMT). No significant differences were observed in P4 levels. In tissue homogenates, the levels of all the steroid hormones (P4,

Table 2

Means and standard deviations results of the individual ANOVA analysis performed to find significant differences for dehydroepiandrosterone (DHEA), androstenedione (A4), testosterone (T4), progesterone (P4), 17 $\beta$ -oestradiol (E2) and oestrone sulphate (SO4E1), immunohistochemistry (IHC) and RT-PCR data for ER $\beta$ -IHC, ER $\beta$ -N (N-terminal domain), ER $\beta$ -Z (DNA binding domain), ER $\beta$ -C (steroid binding domain), AR-IHC, AR-N (N-terminal domain), AR-Z (DNA binding domain), and AR-C (steroid binding domain), and RT-PCR data for CYP19A1, steroid sulphatase (STS) and estrogen sulfotransferase (EST) variables recorded on normal, canine malignant non-IMC mammary tumours (MMT) and inflammatory mammary carcinoma (IMC) tissue specimens

	Normal		MMT		IMC		$R^2$	$p$ -value
	Means	S.D.	Means	S.D.	Means	S.D.		
Androgens								
DHEA serum	4.25 <sup>a</sup>	1.55	7.08 <sup>a</sup>	0.44	13.17 <sup>b</sup>	3.36	0.67	<0.0001
A4 serum	1.48 <sup>a</sup>	0.70	2.23 <sup>a,b</sup>	0.41	3.92 <sup>b</sup>	1.59	0.40	0.0113
T4 serum	8.51 <sup>a</sup>	3.59	20.45 <sup>b</sup>	0.63	37.30 <sup>c</sup>	10.76	0.66	<0.0001
DHEA tissue	72.07 <sup>a</sup>	44.03	245.54 <sup>a</sup>	24.98	676.79 <sup>b</sup>	173.73	0.79	<0.0001
T4 tissue	0.61 <sup>a</sup>	8.06	48.90 <sup>b</sup>	0.66	274.79 <sup>c</sup>	32.07	0.96	<0.0001
A4 tissue	41.6 <sup>a</sup>	15.77	136.7 <sup>a</sup>	24.91	1027.3 <sup>a</sup>	1221.68	0.28	0.1246
Progestagens								
P4 serum	0.22 <sup>a</sup>	0.12	0.23 <sup>a</sup>	0.28	0.26 <sup>a</sup>	0.09	0.01	0.85
P4 tissue	1.23 <sup>a</sup>	1.72	4.79 <sup>b</sup>	0.15	15.5 <sup>c</sup>	3.01	0.87	<0.0001
Estrogens								
E2 serum	60.73 <sup>a</sup>	39.78	202.06 <sup>b</sup>	11.95	153.39 <sup>c</sup>	25.80	0.72	<0.0001
SO4E1 serum	1.37 <sup>a</sup>	0.74	3.01 <sup>b</sup>	0.25	6.20 <sup>c</sup>	1.18	0.81	<0.0001
E2 tissue	150.65 <sup>a</sup>	29.73	278.31 <sup>b</sup>	34.853	627.01 <sup>c</sup>	97.09	0.88	<0.0001
SO4E1 tissue	405.10 <sup>a</sup>	84.07	1023.30 <sup>a</sup>	45.09	2.385.30 <sup>b</sup>	950.21	0.58	0.0005
ER $\beta$								
ER $\beta$ -IHC	Low 0/6, moderate 3/6, intense 3/6	1.14	Low 3/5, moderate 1/5, intense 1/5		Low 2/9, moderate 4/9, intense 3/9	0.78	0.13	0.18
ER $\beta$ -N	0.57 <sup>a</sup>	0.58	0.20 <sup>a</sup>	0.19	1.37 <sup>a</sup>	1.60	0.21	0.14
ER $\beta$ -Z	0.84 <sup>a</sup>	1.26	2.03 <sup>a</sup>	2.75	1.14 <sup>a</sup>	2.48	0.05	0.67
ER $\beta$ -C	0.48 <sup>a</sup>	0.60	1.30 <sup>a</sup>	1.73	0.34 <sup>a</sup>	0.47	0.15	0.28
AR								
AR-IHC	Low 3/6, moderate 3/6, intense 0/6	0.83	Low 4/6, moderate 2/6, intense 0/6		Low 2/10, moderate 3/10, intense 5/10	0.82	0.31	0.03
AR-N	105.97 <sup>a</sup>	85.82	20.36 <sup>a</sup>	16.47	10.59 <sup>b</sup>	65.74	0.47	0.0029
AR-Z	947.80 <sup>a</sup>	757.47	121.7 <sup>b</sup>	42.45	25.10 <sup>b</sup>	20.74	0.54	0.0006
AR-C	0.86 <sup>a</sup>	0.35	0.67 <sup>a</sup>	0.56	0.12 <sup>b</sup>	0.14	0.49	0.0015
Enzymes								
CYP19A1	6.00 <sup>a</sup>	45.84	42.49 <sup>a</sup>	3.75	79.57 <sup>a</sup>	190.07	0.05	0.59
STS	121.73 <sup>a</sup>	106.40	57.93 <sup>a,b</sup>	121.21	8.00 <sup>b</sup>	7.41	0.27	0.049
EST	49.39 <sup>a</sup>	65.65	12.22 <sup>a</sup>	7.53	13.58 <sup>a</sup>	25.46	0.17	0.18

The  $R^2$  (variability explained by the model) and the  $p$ -values for each variable are also shown. Tissue steroid levels are expressed in  $\mu\text{g/g}$  (except for E2 and T which are expressed in ng/ml) and serum steroid levels in ng/ml (except for E2 and T which are expressed in pg/ml). Immunohistochemical data are expressed as labelling intensity scores as low, moderate and intense. RT-PCR data are expressed as values normalised to three house-keeping genes (18s, GAPDH,  $\beta$ -Actin). Means with different letters (a–c) in the same line denote statistical differences ( $p < 0.05$ ).

DHEA, A4, T4, SO4E1 and E2) for each IMC specimen were roughly three-fold the mean values recorded for the MMT and control specimens.

It should be noted that we did not determine the oestrogen  $\alpha$  receptor in our specimens since in a previous study in which 33 cases of canine IMC were examined [7,20], no tumour specimen was ER $\alpha$ -positive, and for Q-PCR there was no signal of growing curve. No significant differences among specimens were observed in oestrogen receptor  $\beta$  levels, as determined by immunohistochemistry, nor in the expression of the receptor determined by quantitative PCR. Using this last procedure, the three domains, N-terminal, DNA binding and steroid binding, were independently analysed and all three were coincident in the lack of significant differences between the three groups of samples.

In contrast, when we compared the expression of the androgen receptor among the tissue specimens, significant differences emerged for all the domains analysed. Despite lower expression levels of all the domains detected in the IMC tumour specimens, these differences were especially significant for the steroid-binding domain ( $p < 0.0015$ ) compared to the MMT and control tissue specimens. This lower expression of the androgen receptor was, nevertheless, not confirmed by our immunohistochemical findings, in that significantly higher labelling intensities were observed in the IMC compared to the MMT specimens.

We also examined the expression in the tissue samples of the enzymes catalysing the different reactions involved in converting androgens to oestrogens (aromatase or CYP19A1), oestrone sulphate to oestradiol or oestrone

(steroid sulphotase or STS) and oestrone to oestrone sulphate (estrogen sulfotransferase or EST). The results shown in Table 2 indicate significantly reduced STS expression in IMC specimens compared to control tissue but not to the MMT specimens, despite lower mean levels recorded for IMC. CYP19A1 expression was higher in the IMC samples compared to the remaining specimens, although differences lacked significance probably as a consequence of the high intra-group variability (coefficient of variation = 207.56) shown by these data. Results for EST did not show significant differences among specimens ( $p > 0.05$ ) indicating a similar behaviour of this enzyme regardless of the sample tested.

#### 4. Discussion

Human inflammatory breast carcinoma (IBC) and canine inflammatory mammary carcinoma (IMC) are the most malignant breast cancers; their prognosis is extremely poor, yet their prevalence is low [1–3]. Nonetheless, the current multimodal treatment regimen for IBC, with or without surgery, has improved the disease-free survival and overall survival of patients [10,23]. Fortunately, this type of breast cancer is rare both in humans and dogs, although the prevalence of IMC seems to have increased in the last few decades [7,24], as did the incidence of IBC in women in the 1990s [25]. Clinical presentation resembles that of an inflammatory process such as dermatitis or mastitis [8]. The only distinctive feature for a histological diagnosis is massive invasion of dermal lymph nodes by neoplastic cells [7], which block the drainage of lymph leading to the characteristic oedema [8,9]. Highly angiogenic, invasive and metastatic [10] features are common to both inflammatory breast carcinomas, although in the dog there is also some histopathological evidence of lipid secretion by IMC tumour cells, possibly steroids [7], not described in humans probably due to the unavailability of non-treated tumour specimens. Because of these features common to IBC and IMC, canine inflammatory mammary carcinoma has been proposed as a natural model of IBC [7,20]. This model has the advantage that it provides spontaneously affected non-treated tissue samples not available from humans.

The hormone dependency of breast cancer has been the subject of intense investigation [26]. Both normal and neoplastic breast tissue contains and produces several forms of androgens [27]. Androgens may influence breast cancer risk directly by binding to the AR or indirectly through their conversion to oestradiol [28]. Our results point to the activation of this latter pathway in IMC for two reasons: (a) high androgen production, attributed elsewhere to local synthesis [26,29], was reflected in our experiments by the significantly higher tissue and serum levels of DHEA, A4 and T in IMC compared to MMT and control breast tissues and (b) interestingly all three AR domains analysed showed significantly lower expression in the IMC specimens. These two findings indicate that the high amounts of androgens found here in canine

mammary tissue, are proportionally superior to that of androgen receptor, suggesting that either the androgens not used in the tissue would be redirected to the blood, or can be used in the tissue through another mechanism not implicating the androgen receptor, the latter being the hypothesis we would support. Thus, the androgen receptor does not seem to mediate alone the effect of this high production of androgens. This hypothesis points to the conversion of androgens to oestrogens through the action of the enzyme CYP19A1, which tends to be expressed (although non-significantly) in greater amounts in the IMC tissue samples. According to the findings of Zhou et al. [30], who reported anti-proliferative testosterone effects on the mammary epithelium directly mediated by the AR, this high androgen production in IMC not mediated by the AR would render the proliferative effects observed in cases of IMC probably through the conversion of androgens into oestrogens.

Immunohistochemistry data show, however, a labelling intensity in all IMC samples. This apparent contradiction has been detected for other steroid receptors [31,32] and according to Murphy and Watson [33] can be due to the kind of antibody used.

It is well known that oestrogen modulates cell growth and differentiation in the mammary gland and numerous animal studies have shown that this hormone can induce breast cancer [34]. The levels of oestrogens detected in our canine tissues were significantly higher (three-fold) in the IMC compared to the MMT specimens. This notable increase in all the oestrogens measured in IMC tissue can be obtained by a high uptake of steroids from the plasma, or confirms the fact that the neoplastic mammary gland is an endocrine tissue by virtue of its oestrogen and androgen production [11,12,27,28,35]; it can then be hypothesized that these hormones, particularly high in inflammatory mammary carcinoma, can be accumulated and/or used *in situ*.

This finding should correlate with the high expression levels of the oestrogen receptor, which nevertheless failed to differ in the three types of specimen examined. Neither did our immunohistochemical results indicate significant differences between IMC and MMT specimens. Thus, if androgens and oestrogens, whose levels were increased in the IMC tissue samples, are products of local steroid synthesis, the normal expression of the oestrogen receptor beta and diminished expression of the androgen receptor observed would indicate that steroid production follows another pathway. Indeed, the expression patterns shown by the enzymes aromatase, steroid sulphotase and estrogen sulfotransferase, together with the high oestrone sulphate levels detected, suggest the transformation of DHEA, androstenedione and testosterone to oestrone and oestradiol and, in turn, the conversion of oestrone and oestradiol into oestrone sulphate, which appeared in highest amounts in the IMC tissue samples. Since STS expression was, in turn, significantly lower in these specimens, this would suggest no reversal of oestrone sulphate to oestrone or oestradiol, which was confirmed by the lack of substantial amounts of the oestrogen receptor.



Oestrone sulphate could thus be deposited as lipid droplets to act as a reservoir, as has been reported previously [37]. In effect, a high proportion of lipid-rich carcinomas has been described among cases of IMC, but equivalent observations have not been possible in human IBC due to a lack of tumour specimens [5].

There have been reports of higher concentrations of SO4E1 in cancerous than non-cancerous breast tissue [18] and this steroid is thought to play an essential role in regulating several key physiological and pathological processes [38]. In addition, good inverse correlation has been observed between intratumoral steroid sulphatase mRNA expression and relapse-free survival in breast cancers [39]. Further, significantly higher concentrations of this steroid have been reported in cancerous tissues than in plasma in postmenopausal patients [19]. The higher concentration [40] and longer half-life of SO4E1 [41] compared to oestradiol [17] suggests a reservoir for the formation of biologically active oestrogens in breast tissue [16]. However, inconsistent with our findings, quantitative determinations made in breast cancer tissue indicate that the conversion of oestrone sulphate into oestradiol through the oestrone sulphatase pathway is 40- to 500-fold that of the conversion of androgens into oestradiol mediated by the aromatase pathway [19]. Despite reports of good correlation between low STS mRNA expression and relapse-free survival in breast cancers [36], our results would suggest a poor prognosis related to low STS expression levels in IMC. Also, our study and previous [20] reflect that a majority of canine carcinomas are ER $\alpha$ –, ER $\beta$ + which would give if compared to human breast cancer and according to Murphy and Watson [33] a specific function which relation with prognosis is difficult to establish.

Our findings clearly indicate that oestrone sulphate levels are significantly elevated in IMC with respect to non-malignant control tissue. This gives rise to a reservoir in the form of lipid droplets, rendering the typical neoplastic appearance of IMC (Fig. 1). In turn, this biologically active oestrogen pool could enhance vascular endothelial growth

factor (VEGF) [42], explaining the highly angiogenic and angio-invasive nature of the aggressive behaviour of IMC and IBC. These hypothesis can be also supported by the different expression of the caveolin1 (CAV1) gene detected in IMC tissue specimens (non-published results), a gene encoding a scaffold protein that is the main component of the plasma membrane of caveolae found in most cell types and that promotes cell cycle progression and by the significant correlations between this gene and both receptors and the aromatase. These last events are, nevertheless, yet to be demonstrated.

## Acknowledgments

This work was supported by the Spanish National project SAF-2005-03559. A.R.S.-A. is the receptor of a FPU (Ministry of Education and Science) fellowship.

## References

- [1] P.H. Levine, S.C. Steinhorn, L.G. Ries, J.L. Aron, Inflammatory breast cancer. The experience of the surveillance, epidemiology, and end results (SEER) program, *J. Natl. Cancer Inst.* 74 (1985) 291–297.
- [2] G. Somlo, J.H. Doroshow, S.J. Forman, T. Odom-Mayon, J. Lee, W. Chow, V. Hamasaki, L. Leong Jr., R. Morgan, K. Margolin, J. Raschko, S. Shibata, M. Telef, Y. Yen, J. Simpson, A. Molina, High-dose chemotherapy and stem cell rescue in the treatment of high risk breast cancer: prognostic indicators of progression-free and overall survival, *J. Clin. Oncol.* 15 (1997) 2882–2893.
- [3] S.J. Victor, E.M. Horwitz, V.R. Kini, A.A. Martinez, J.E. Pettinga, C.F. Dmuchowski, D.A. Decker, F.M. Wilner, F.A. Vicini, Impact of clinical, pathologic, and treatment-related factors of patients with local advanced breast cancer treated with multimodality therapy, *Am. J. Clin. Oncol.* 22 (1999) 119–125.
- [4] K.J. van Golen, S. Davies, Z.F. Wu, Y. Wang, C.D. Bucana, H. Root, S. Chandrasekharappa, M. Strawderman, S.P. Ethier, S.D. Merajver, A novel putative low-affinity insulin-like growth factor-binding protein, LIBC (lost in inflammatory breast cancer), and *RhoC* GTPase correlate with the inflammatory breast cancer phenotype, *Clin. Cancer Res.* 5 (9) (2000) 5832–5838.
- [5] L. Peña, M.D. Pérez-Alenza, A. Rodríguez-Bertos, A. Nieto, Canine inflammatory mammary carcinoma: histopathology, immunohistochemistry, and clinical implications of 21 cases, *Breast Cancer Res. Treat.* 78 (2003) 141–148.
- [6] M.L. Alpaugh, J.S. Tomlinson, Z.M. Shao, S.H. Barsky, A novel human xenograft model of inflammatory breast cancer, *Cancer Res.* 59 (20) (1999) 5079–5084.
- [7] M.D. Pérez-Alenza, E. Tabanera, L. Peña, Inflammatory mammary carcinoma in dogs: 33 cases (1995–1999), *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 219 (2001) 110–114.
- [8] F.A. Tavassoli, Inflammatory carcinoma. Infiltrating carcinoma: special types, in: *Pathology of the Breast*, 2nd ed., McGraw-Hill, New York, 1999, pp. 519–522, 538–541.
- [9] S.H. Giordano, Update on locally advanced breast cancer, *Oncologist* 8 (2003) 521–530.
- [10] I.A. Jaiyesimi, A.U. Buzdar, G. Hortobagyi, Inflammatory breast cancer: a review, *J. Clin. Oncol.* 10 (1992) 1014–1024.
- [11] A. Vermeulen, J.P. Deslypere, R. Paridaens, Steroid dynamics in the normal and carcinomaous mammary gland, *J. Steroid Biochem.* 25 (1986) 799–802.
- [12] M.A. Blankenstein, J. van de Ven, I. Maitimu-Smeele, G.H. Donker, P.C. de Jong, J. Daroszewski, J. Szymczak, A. Milewicz, J.H. Thijssen,

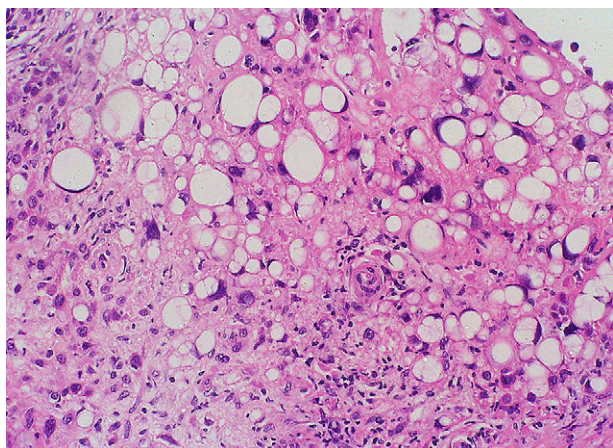


Fig. 1. Canine inflammatory mammary carcinoma. Lipid-rich carcinoma. H–E 40 $\times$ . Abundant enlarged lipid droplets in the neoplastic cells.

- Intratumoral levels of estrogens in breast cancer, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 69 (1999) 293–297.
- [13] Y.J. Abul-Hajj, R. Iverson, D.T. Kiang, Aromatization of androgens by human breast cancer, *Steroids* 33 (1979) 205–222.
- [14] A. Lipton, S.J. Santner, R.J. Santen, H.A. Harvey, P.D. Feil, D. White-Hershey, M.J. Bartholomew, C.E. Antle, Aromatase activity in primary and metastatic human breast cancer, *Cancer* 59 (1987) 779–782.
- [15] T.L. Dao, C. Hayes, C.P.R. Libby, Steroid sulfatase activities in human breast tumors, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 146 (1984) 381–384.
- [16] J.R. Pasqualini, C. Gelly, F. Lecerf, Estrogen sulfates: biological and ultrastructural responses and metabolism in MCF-7 human breast cancer cells, *Breast Cancer Res. Treat.* 8 (1986) 233–240.
- [17] J.R. Pasqualini, C. Gelly, B.L. Nguyen, C. Vella, Importance of estrogen sulfates in breast cancer, *J. Steroid Biochem.* 34 (1989) 155–163.
- [18] M. Edery, J. Goussard, L. Dehennin, R. Scholler, J. Reiffsteck, M.A. Drosowsky, Endogenous oestradiol-17b concentration in breast tumours determined by mass fragmentography and by radioimmunoassay: relationship to receptor content, *Eur. J. Cancer* 17 (1981) 115–120.
- [19] J.R. Pasqualini, G. Chetrite, C. Blacker, M.C. Feinstein, L. Delalonde, M. Talbi, C. Maloche, Concentrations of estrone, estradiol, and estrone sulfate and evaluation of sulfatase and aromatase activities in pre- and postmenopausal breast cancer patients, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81 (4) (1996) 1460–1464.
- [20] J.C. Illera, M.D. Pérez-Alenza, A. Nieto, M.A. Jiménez, G. Silván, S. Dunner, L. Peña, Steroids and receptors in canine mammary cancer, *Steroids*, April 20, 2006.
- [21] K.M. Ririe, R.P. Rasmussen, C.T. Wittwer, Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction, *Anal. Biochem.* 245 (1997) 154–160.
- [22] J. Vandesompele, K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paep, F. Speleman, Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes, *Genome Biol.* 3 (7) (2002) (research0034).
- [23] A.F. Chambler, P.J. Drew, D.A. Hill, A. Darzi, J.R. Monson, Inflammatory breast carcinoma, *Surg. Oncol.* 4 (1995) 245–254.
- [24] S.J. Susaneck, T.A. Allen, J. Hoopes, S.J. Withrow, D.W. Macy, Inflammatory mammary carcinoma in the dog, *J. Am. An. Hosp. Assoc.* 19 (1983) 971–976.
- [25] S. Chang, S.L. Parker, T. Pham, A. Buzdar, S.D. Hursting, Inflammatory breast carcinoma incidence and survival: the surveillance, epidemiology and end result program of the National Cancer Institute, 1975–1992, *Cancer* 75 (Suppl. 1) (1994) 275–282.
- [26] J.C. Illera, G. Silván, M.D. Pérez-Alenza, A.R. Sánchez-Archidona, A. Nieto, L. Peña, The possible role of IGF-I and androgens in the development of canine inflammatory mammary carcinoma, in: *Proceedings of the Fourth Hormonal Carcinogenesis*, 2003.
- [27] D.J. Liao, R.B. Dickson, Roles of androgens in the development, growth and carcinogenesis of the mammary gland, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 80 (2002) 175–189.
- [28] M. Maggiolini, O. Donze, E. Jeannin, S. Andò, D. Picard, Adrenal androgens stimulate the proliferation of breast cancer cells as direct activators of estrogen receptor  $\alpha$ , *Cancer Res.* 59 (1999) 4864–4869.
- [29] L. Peña, G. Silván, M.D. Pérez-Alenza, A. Nieto, J.C. Illera, Steroid hormone profile of canine inflammatory mammary carcinoma: a preliminary study, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 84 (2003) 211–216.
- [30] J. Zhou, S. NG, O. Adesanya-Famuiya, K. Anderson, C.A. Boundy, Testosterone inhibits estrogen-induced mammary epithelial proliferation and suppresses estrogen receptor expression, *FASEB J.* 14 (12) (2000) 1725–1730.
- [31] M. Langer, E. Kubista, M. Schemper, J. Spona, Androgen receptors, serum androgen levels and survival of breast cancer patients, *Arch. Gynecol. Obstet.* 247 (1999) 203–209.
- [32] V. Kuenen-Boumeester, T.H. Van der Kwast, W.L. van Putten, C. Claassen, B. van Ooijen, S.C. Henzen-Logmans, Immunohistochemical determination of androgen receptors in relation to oestrogen and progesterone receptors in female breast cancer, *Int. J. Cancer* 52 (1992) 581–584.
- [33] L.C. Murphy, P.H. Watson, Is oestrogen receptor- $\beta$  a predictor of endocrine therapy responsiveness in human breast cancer? *Endocr. Relat. Cancer* 13 (2006) 327–334.
- [34] F. Girdler, I. Brotherick, The oestrogen receptors (ER  $\alpha$  and ER  $\beta$ ) and their role in breast cancer: a review, *Breast* 9 (2000) 194–200.
- [35] J.J.H. Thijssen, M.A. Blankenstein, W.R. Miller, A. Milewicz, Estrogen in tissues: uptake from the peripheral circulation or local production, *Steroids* 50 (1987) 1–3.
- [36] G.S. Chetrite, J. Cortes-Prieto, J.C. Philippe, J.R. Pasqualini, Comparison of estrogen concentrations, estrone sulfatase and aromatase activities in normal, and in cancerous, human breast tissues, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 72 (1–2) (2000) 23–27.
- [37] M.J. Reed, A. Puroih, Sulphatase inhibitors: the rationale for the development of a new endocrine therapy, *Rev. Endocr. Relat. Cancer* 45 (1993) 51–62.
- [38] R. Horbikirk, Steroid sulfation, *Trends Endocr. Metab.* 4 (1993) 69–74.
- [39] T. Utsumi, N. Yoshimura, S. Takeuchi, J. Ando, M. Maruta, K. Maeda, N. Harada, Steroid sulfatase expression is an independent predictor of recurrence in human breast cancer, *Cancer Res.* 59 (1999) 377–381.
- [40] C.T. Noel, M.J. Reed, H.S. Jacobs, V.H. James, The plasma concentration of oestrone sulphate in postmenopausal women: lack of diurnal variation, effect of ovariectomy, age and weight, *J. Steroid Biochem.* 14 (11) (1981) 1101–1105.
- [41] H.J. Ruder, L. Loriaux, M.B. Lipsett, Estrone sulfate: production rate and metabolism in man, *J. Clin. Invest.* 51 (4) (1972) 1020–1033.
- [42] C. Dabrosin, P.J. Margetts, J. Gauldie, Estradiol increases extracellular levels of vascular endothelial growth factor in vivo in murine mammary cancer, *Int. J. Cancer* 107 (2003) 535–540.



# COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN MOLECULAR DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS $\beta$ (RE $\beta$ ) Y DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS (RA) EN CARCINOMAS INFLAMATORIOS MAMARIOS CANINOS Y TUMORES MAMARIOS MALIGNOS CANINOS “NO INFLAMATORIOS”.

A. Rodríguez Sánchez-Archidona<sup>1</sup>, M.D. Pérez-Alenza<sup>2</sup>, G. Silván<sup>3</sup>, J.C. Illera<sup>3</sup>, L. Peña<sup>2</sup>, S. Dunner<sup>1</sup>

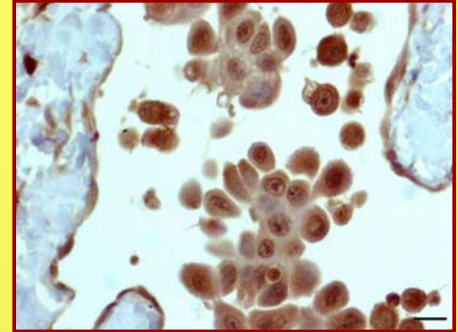
<sup>1</sup> Laboratorio de Genética, Dpto. Producción Animal. <sup>2</sup>Dpto. Medicina y Cirugía Animal (Anatomía Patológica). <sup>3</sup>Laboratorio de Endocrinología, Dpto Fisiología Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. 28040- Madrid.



Carcinoma inflamatorio mamario canino. Marcado eritema.

## INTRODUCCIÓN

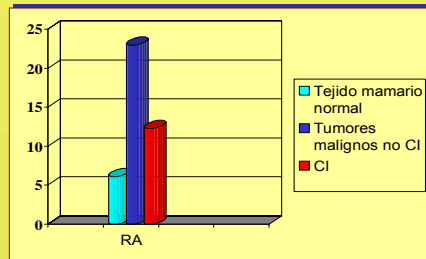
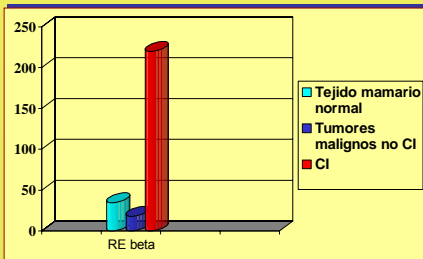
El carcinoma inflamatorio mamario (CI) es un tipo especial de tumor mamario localmente avanzado con aspectos clínicos e histopatológicos diferenciales y una prevalencia muy baja. El carcinoma inflamatorio mamario canino presenta características epidemiológicas, clínicas e histopatológicas semejantes a las del carcinoma inflamatorio mamario humano, por lo que ha sido propuesto como modelo natural para la enfermedad humana (1). Estudios previos de CI canino relativos a la secreción y regulación de diferentes hormonas tanto en suero como en el propio tejido mamario, indican que existe un mecanismo endocrino especial en el desarrollo del CI canino (2-4). Concretamente, en los casos de CI existe gran expresión inmunohistoquímica del receptor de estrógenos  $\beta$  (RE $\beta$ ) y del receptor de andrógenos (RA) (4). El objetivo de este trabajo es conocer la expresión molecular del receptor de estrógenos  $\beta$  (RE $\beta$ ) y del receptor de andrógenos en muestras de carcinoma inflamatorio canino y de tumores mamarios malignos.



Carcinoma inflamatorio mamario canino. Células metastásicas en un vaso linfático positivas a RE $\beta$ . Streptavidina-biotina-peroxidasa.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Para este estudio se han utilizado muestras de 19 tumores mamarios (12 CI de diversos tipos histológicos con grado histológico de malignidad III y 7 tumores malignos no CI de diversos tipos histológicos con grado histológico de malignidad III) y de 2 glándulas mamarias normales. Se tomaron muestras adyacentes para histopatología (fijación en formol tamponado) y análisis molecular (RNA later). El RNA total fue extraído y se realizó el análisis de expresión de RE $\beta$  y RA mediante PCR a tiempo real.



## RESULTADOS

- RE $\beta$  se expresa en mayor grado, aunque no significativamente, en CI respecto a los tumores malignos no CI ( $P=0,18$ ).
- RA no presenta diferencias significativas de expresión entre los distintos grupos estudiados ( $P=0,5$ ).

## DISCUSIÓN

Los mecanismos de actuación hormonal sobre la etiología y desarrollo del CI no están claros, pero sí se sabe que en la glándula mamaria los estrógenos y andrógenos modulan el crecimiento y diferenciación de las células mamarias normales y tumorales (5-8). En el caso de carcinoma inflamatorio canino se han encontrado cantidades hormonales mayores de androstenediona, dihidroepiandrosterona, testosterona, progesterona, sulfato de estrona y 17 $\beta$ -estradiol en homogeneizados de tejido mamario CI, respecto a mamas normales, tumores benignos y tumores malignos no CI (2-4). Es posible que una gran proporción de las hormonas esteroideas encontradas en el tejido mamario del CI haya sido producida “in situ” (2) y realicen su función de una manera autocrina o paracrina. Todos los niveles séricos de las hormonas estudiadas están significativamente elevados en los casos de CI, excepto el 17 $\beta$  estradiol que, a pesar de los altos niveles encontrados en el tumor, se encuentran significativamente disminuidos. Esto parece indicar una utilización local de los estrógenos a través de sus receptores (2,4).

Sin embargo, la actuación local del exceso estrogénico no parece estar mediada por el RE $\alpha$ , sino, probablemente, por el RE $\beta$ , ya que todos los CI analizados mediante técnicas inmunohistoquímicas fueron negativos a RE $\alpha$  (2,4). La expresión molecular del RE $\beta$  encontrada en el presente estudio, confirma esta hipótesis. El análisis de expresión molecular del RA, no revela diferencias entre los grupos de tumores analizados (tumores malignos no CI y CI), en contraposición a la mayor expresión con técnicas inmunohistoquímicas encontrada en los casos de CI (3,4). La expresión inmunohistoquímica en la especie humana del AR ofrece resultados contradictorios respecto al porcentaje de expresión, relación con el tipo histológico, pronóstico y correlación con otros receptores esteroideos (6). Y no está claro el mecanismo por el cual los andrógenos ejercen su acción en la glándula mamaria, pudiendo realizarse de manera directa sobre el AR, ó de forma indirecta mediante su conversión en estradiol (7).

- Peña L, Pérez-Alenza MD, Rodríguez-Bertos A, Nieto A. Canine inflammatory mammary carcinoma: histopathology, immunohistochemistry, and clinical implications of 21 cases. *Breast Cancer Res Treat* 78: 141-148, 2003.
- Peña L, Silván G, Pérez-Alenza MD, Nieto A, Illera JC. Steroid hormone profile of canine inflammatory mammary carcinoma: a preliminary study. *J Steroid Biochem Mol Biol* 84: 211-216, 2003.
- Illera JC, Silván G, Pérez-Alenza MD, Sánchez-Archidona AR, Nieto A, Peña L. The possible role of IGF-I and androgens in the development of canine inflammatory mammary carcinoma. 4<sup>th</sup> volumen de Hormonal Carcinogenesis, 2003.
- Illera JC, Pérez-Alenza MA, Nieto A, Jiménez MA, Silván G, Peña L. Serum and tissue levels of androgens and estrogens and immunohistochemistry of androgen and estrogen receptors ( $\alpha$  and  $\beta$ ) in canine malignant mammary tumors and inflammatory mammary carcinomas: A prospective case control study. *Breast Cancer Research* (aceptado).
- Maggiolini M, Carpine A, Bonfiglio D, Pezzi V, Rago V, Marasco S, Picard D, Ando S. The direct proliferative stimulus of dehydroepiandrosterone on MCF7 breast cancer cells is potentiated by over expression of aromatase. *Mol Cell Endocrinol* 184: 163-171, 2001.
- Liao DJ, Dickson RB. Roles of androgens in the development, growth and carcinogenesis of the mammary gland. *J Steroid Biochem Mol Biol* 80: 175-189, 2002.
- Birrell SN, Hall RE and Tilley WD. Role of the androgen receptor in human breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 3: 95-103, 1998.
- Maggiolini M, Donze O, Jeannin E, Ando S and Picard D. Adrenal androgens stimulate the proliferation of breast cancer cells as direct activators of estrogen receptor  $\alpha$ . *Cancer Res* 59: 4864-69, 1999.



# Androgen receptor in the canine mammary inflammatory carcinoma: immunohistochemistry, gene expression, and androgens level in serum and tissue

Rodríguez Sánchez-Archidona, Ana<sup>1</sup>; Jiménez, M Ángeles<sup>2</sup>; Pérez-Alenza, M Dolores<sup>2</sup>; Silván, Gema; Illera, Juan C; Dunner, Susana<sup>1</sup>; Peña, Laura.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dpto Producción Animal, <sup>2</sup> Dpto Medicina y Cirugía (Anatomía Patológica), <sup>3</sup> Dpto Fisiología. Facultad de Veterinaria. UCM. 28040 Madrid. Spain.

## Introduction



The inflammatory breast carcinoma (IBC) is a type of locally advanced human mammary carcinoma. IBC has distinct clinical and pathological features (1,2). The dog is a species in which spontaneous inflammatory mammary carcinoma (IMC) has been reported and where several similarities have been found with IBC concerning epidemiology, histopathology and clinical characteristics (3). IMC has been proposed as a natural model to study IBC.

Normal and neoplastic mammary gland secrete steroid hormones as estrogens, androgens and other hormones, which are related to the development of tumours (4). The biological functions of these and others steroid hormones are mediated by a family of steroid hormone receptor (SHRs). There is little information about androgen receptor (AR) in canine tissues.

## Material and Methods

A total of 16 samples: 8 inflammatory mammary carcinomas, 6 "non-inflammatory" mammary carcinoma, with histological malignant grade III, three healthy tissues and serum of the corresponding animals were prospectively collected. The tissue samples were analyzed for AR expression level through immunohistochemistry and Real time PCR, serum levels and content (by EIA) of dehydroepiandrosterone- DHEA, androstenedione-A4, and testosterone-T.

Figure 1: Canine mammary tumor. Tubular carcinoma (non-inflammatory mammary malignant tumor) low positive to AR. Heterogeneous staining. Streptavidin-biotin-peroxidase. Bar= 22 µm.

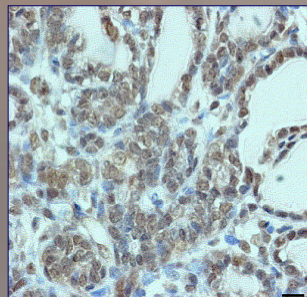
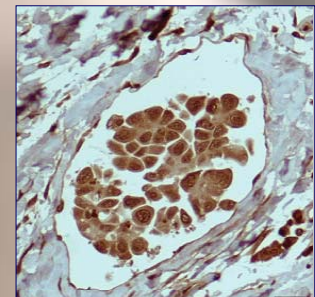


Figure 2: Canine mammary tumor. Inflammatory mammary carcinoma. Metastatic cells in lymphatic vessel intensely positive to AR. Streptavidin-biotin-peroxidase. Bar= 44 µm.



## Results and Discussion

AR immunoexpression was increased in IMC cases in agreement with serum and tissue levels of androgens. However, all three AR domains analysed for gene expression (N-terminal, DNA binding and steroid binding domains) showed a lower expression in IMC for DNA binding domain (significant) and the two other domains (but non significant) when compared to non IMC carcinomas, and normal tissues. This is in clear contradiction with immunohistochemistry and hormone levels measured in tissue and serum. In human breast cancer, immunohistochemistry of AR offers contradictory results on its percentage of expression, relationships with histological type, prognostic and correlation with other steroid receptors (5). We explain these and our results through the fact that AR expression with Real Time PCR is measured on a pool of RNAm corresponding probably to different cells (epithelial cells, connective cells...), when immunohistochemistry gives the opportunity of choosing the cells by microscopy. We are keen in revising those results by analysing expression in cells sampled with laser technology.

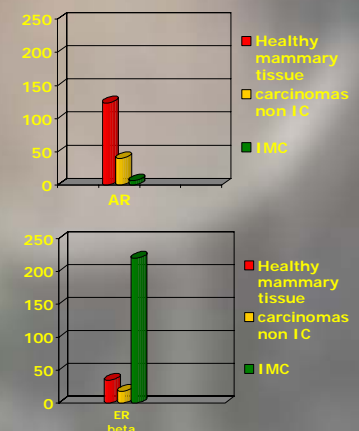


Figure 3: AR Expression levels in the three types of samples analysed

1. Tavassoli FA. Pathology of the Breast. 2<sup>nd</sup> edn, McGraw-Hill, New York, 1999, pp 519-522, 538-541.
2. Jajlesimi IA, Buzdar AU, Hortobagyi G. Inflammatory breast cancer: a review. J Clin Oncol 1992; 10: 1014-1024.
3. Perez-Alenza MD, Tabanera E, Peña L. Inflammatory mammary carcinoma in dogs: 33 cases (1995-1999). J Am Vet Med Assoc 219: 1110-1114, 2001.
4. Vermeulen A, Deslypere JP, Paridaens R. Steroid dynamics in the normal and carcinomaous mammary gland. J Steroid Biochem 25: 799-802, 1986.
5. Langer M, Kubista E, Schlemper M et al. Androgen receptors, serum androgen levels and survival of breast cancer patients. Arch Gynecol Obstet 247: 203-209, 1990.





# ANDROGEN AND ESTROGEN $\beta$ RECEPTOR GENE EXPRESSION IN CANINE INFLAMMATORY MAMMARY CARCINOMA AND “NON-INFLAMMATORY” MAMMARY CARCINOMA

Rodríguez Sánchez-Archidona, Ana<sup>1</sup>; Jiménez, M Ángeles<sup>2</sup>; Pérez-Alenza, M Dolores<sup>2</sup>; Illera, Juan C<sup>3</sup>; Peña, Laura<sup>2</sup>; Dunner, Susana<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Dpto Producción Animal, <sup>2</sup> Dpto Medicina y Cirugía (Anatomía Patológica), <sup>3</sup> Dpto Fisiología.

Facultad de Veterinaria. UCM. 28040 Madrid. Spain

## INTRODUCTION

The inflammatory breast carcinoma (IBC) is a type of locally advanced human mammary carcinoma. The dog is a species in which spontaneous inflammatory mammary carcinoma (IMC) has been reported and where several similarities have been found with IBC concerning epidemiology, histopathology and clinical characteristics which allow to propose IMC as a natural model for IBC study (1). Different clinical and pathological features exist which are not present in other “non-inflammatory” malignant mammary tumours (MMT): inflammatory mammary carcinoma are highly angiogenic, invasive and metastatic (2), and in the canine species, some histopathologic evidences indicate a lipid secretion by IMC cells, possibly steroids (1).

Normal and neoplastic mammary gland secrete steroid hormones as estrogens, androgens and other steroid hormones whose formation and pathways are crucial in the neoplastic growth and progression of breast cancer (3). The importance of the estrone sulfatase pathway in human breast cancers has been suggested long years ago (4). In this study we compare IMC with MMT and normal mammary tissues, to explain the specific characteristics of IMC for steroidogenesis

## MATERIAL AND METHODS

A total of 23 samples: 11 IMC, 6 MMT (with histological malignant grade III), 6 healthy tissues and serum of all the corresponding animals were prospectively collected. The tissue samples were analyzed for AR and ESR $\beta$  expression level through immunohistochemistry and Real Time PCR (RT-PCR) and Aromatase and Steroid Sulfatase (STS) were analyzed through RT-PCR. Profiles for the androgens dehydroepiandrosterone (DHEA), androstenedione (A4), testosterone (T) and for the estrogens 17 $\beta$ -estradiol (E2) and estrone-sulphate (SO4E1) were measured both in tissue homogenates and in serum by EIA techniques.

## RESULTS

### ANDROGEN RECEPTOR

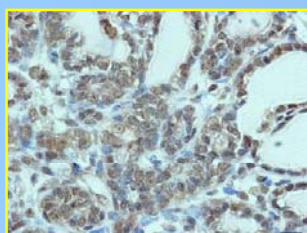


Figure 1: Canine mammary tumor, Tubular carcinoma (IMC) low positive to AR. Heterogeneous staining. Streptavidin-biotin-peroxidase. Bar= 25  $\mu$ m.

All three AR domains analyzed for gene expression (N-terminal, DNA binding and steroid binding domains) by RT-PCR showed a significant lower expression ( $P<.001$ ) in IMC when compared to normal tissues, and when compared to MMT. However, Immunohistochemistry results show a higher expression for IMC. Androgen levels measured in tissue and serum were significantly increased in IMC in all cases but tissue A4.

### ESTROGEN RECEPTOR $\beta$

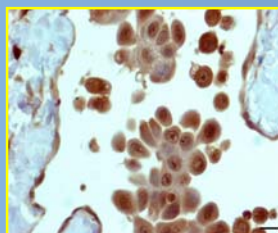


Figure 2: IMC. Metastatic cells in lymphatic vessel intensely positive to ESR $\beta$ . Streptavidin-biotin-peroxidase. Bar= 44  $\mu$ m.

ESR $\beta$  expression was analyzed by RT-PCR for the three domains (N-terminal, DNA binding and steroid binding domains) yielding no significantly different means. Similar results appeared when ESR $\beta$  expression was analyzed by immunohistochemistry. Estrogens levels in canine tissues and serum, are increased in IMC compared to MMT and normal mammary gland, excepting E2 serum levels which were decreased in IMC samples.

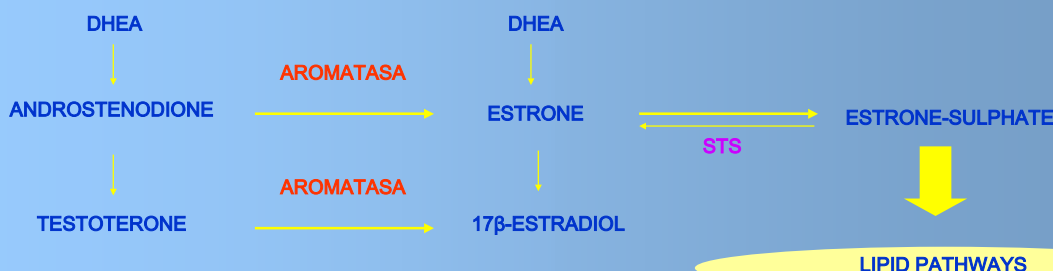
### AROMATASE AND STEROID SUFATASE

We have found a significant decrease of STS expression ( $P=0,05$ ) for IMC respective to normal and MMT samples. In the case of the aromatase (CYP19A1), non significant higher values are found in IMC respective to the other type of samples analysed probably as a consequence of the high intra-group variability (variation coefficient =207,56) found among these data .

## DISCUSSION

In our opinion, the estrogens and the androgens found in the IMC tissues would be synthesized and exerting their function in the mammary gland which acts as an endocrine tissue as previously described (3). However, this high level of steroids are not mediated by their receptors: AR showed a significant lower expression in IMC and ESR $\beta$  values are not significantly different between samples. ER $\alpha$  receptor has not been measured as a previous study on canine IMC (1) showed no ER $\alpha$ -positive IMC. These results together with the high SO4E1 tissue level would indicate the conversion of DHEA, A4 and T to estrone (not measured) and E2 which in turn are converted to SO4E1 explaining the high levels in tissue and serum IMC samples. As STS expression is in turn significantly lower in these tissues, this would indicate no return of SO4E1 to estrone or E2.

Some mechanisms have been suggested to be especially involved in IMC respect to other MMT as are the histopathologic evidences indicating a lipid secretion by IMC cells in the canine species (1). These steroids would be exerting their function through SO4E1 in lipid pathways and accumulate in the form of lipid drops as shown below. Interestingly, it has been demonstrated that estrogens increase vascular endothelial growth factor (VEGF), a key factor for angiogenesis (5), which could explain the high invasive and metastatic capacity of IMC.



1. Perez-Alenza MD, Tabanera E, Peña L: Inflammatory mammary carcinoma in dogs: 33 cases (1995-1999). *J Am Vet Med Assoc* 219: 11 0-1114, 2001.
2. Jaiyesimi IA, Buzdar AU, Hortobagyi G: Inflammatory breast cancer: a review. *J Clin Oncol* 1992; 10: 1014-1024.
3. Vermeulen A, Deslypere JP, Paridaens R: Steroid dynamics in the normal and carcinomatous mammary gland. *J Steroid Biochem* 25: 799-802, 1986.
4. Chetrite GS, Cortes-Prieto J, Philippe JC, Pasqualini JR: Comparison of estrogen concentrations, estrone sulfatase and aromatase activities in normal, and in cancerous, human breast tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol*. Jan-Feb; 72(1-2):23-7, 2000.
5. Dabrosin C, Margetts PJ, Gauldie J: Estradiol increases extracellular levels of vascular endothelial growth factor in vivo in murine mammary cancer. *Int J Cancer* ;107:535-40, 2003.